

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE BIOLOGIQUE DES VOILES JEUNES DE CULTURES DE BACILLES TUBERCULEUX

par L. NÈGRE, A. BOQUET et J. VALTIS.

(Laboratoire de M. le professeur Calmette à l'Institut Pasteur.)

A. Marmorek [1], en 1900, avait étudié les formes non acido-résistantes du bacille tuberculeux et les a considérées comme les formes jeunes de ce microbe.

Après lui, Legroux et Magrou [2] ont décrit la structure des colonies du bacille de Koch et ont constaté qu'elles étaient formées d'une trame filamenteuse se colorant en bleu, sur laquelle se développent les bacilles acido-résistants. Bezançon et Philibert [3] ont eu l'idée de faire une étude morphologique des voiles jeunes de bacilles tuberculeux. Ils ont constaté que ces voiles étaient composés d'une matière amorphe cyanophile, au milieu de laquelle prennent naissance les bacilles acido-résistants et les granulations. D'autre part, Vaudremer [4] a signalé que les bacilles tuberculeux, cultivés en milieux pauvres en albumines, perdent en partie leur pouvoir pathogène à mesure que leur acido-résistance diminue.

En rapprochant ces constatations, nous avons pensé qu'il

serait intéressant de rechercher comment les bacilles tuberculeux se comportent au point de vue de leur virulence, de leurs propriétés biologiques et de leur pouvoir antigène, à ce stade de leur développement où ils ne possèdent pas encore d'acido-résistance ou commencent à peine à l'acquérir [5].

Notre étude a porté sur les voiles jeunes de bacilles tuberculeux dans les six premiers jours de leur développement sur le milieu synthétique de Sauton.

I. — Étude de la virulence des voiles jeunes.

Pour éliminer le rôle possible des bacilles qui ont servi à l'ensemencement, trois ou quatre repiquages sont faits tous les quatre jours; on prend avec l'anse de platine, pour la réensemencer, la partie périphérique du voile qui s'est développée pendant ces quatre jours.

Au bout de cinq ou six passages, on peut admettre que les bacilles du premier ensemencement ont disparu et que le voile jeune ne contient plus que les bacilles développés depuis quatre jours.}

Si on fait une préparation microscopique d'un de ces voiles, on constate qu'il est composé en grande majorité de bacilles non acido-résistants, colorables en bleu, au milieu desquels sont disséminés des bacilles de Koch dont l'acido-résistance est plus ou moins prononcée.

On peut distinguer deux aspects différents de ces voiles jeunes sur milieu de Sauton. Certaines parties sont constituées par une pellicule mince et lisse; d'autres, par des masses beaucoup plus épaisses et écailleuses qui ont une tendance à former des amas spongieux, se développant en profondeur. Il n'existe aucune différence entre elles au point de vue de leur teneur en éléments acido-résistants et en matière cyanophile.

Si on prélève isolément chacune de ces parties et qu'on en ensemence un petit fragment dans un nouveau ballon de liquide de Sauton, on peut obtenir séparément, par repiquages successifs, des cultures minces ou des cultures épaisses. Mais les premières, à mesure qu'elles vieillissent, tendent à revenir à la forme épaisse et écailleuse, de sorte que, vers la quatrième

semaine, les cultures des deux types offrent exactement le même aspect.

Nous avons étudié la virulence des voiles jeunes par inoculation sous-cutanée de 1/100 de milligramme au cobaye, et de la même dose par voie intraveineuse au lapin.

Ces recherches ont été faites avec la souche *Bovine Vallée* qui, aux mêmes doses et par les mêmes voies, tue le cobaye et le lapin en deux ou trois mois avec des lésions généralisées à tous les organes.

INOCULATION AU COBAYE DE VOILES DE QUATRE JOURS.

EXPÉRIENCE I. — Le 11 janvier 1928, trois cobayes reçoivent sous la peau de la cuisse droite 1/100 de milligramme d'un voile de *quatre jours*. Les 28 et 30 janvier, deux meurent. Dans leurs ganglions inguinaux, on constate la présence de rares bacilles acido-résistants et de granulations bleues.

Le 2 mars, un meurt. Il ne présente qu'un ganglion inguinal et un ganglion sous-lombaire hypertrophié, contenant des bacilles sans autres lésions.

EXPÉRIENCE II. — Le 3 février 1928, trois cobayes reçoivent sous la peau de la cuisse droite 1/100 de milligramme d'un voile de *quatre jours*.

Le 28 février, un meurt. Pas de ganglion au point d'inoculation, mais un petit ganglion sous-lombaire hypertrophié (lentille) contenant des bacilles acido-résistants. Pas d'autres lésions.

Le 28 mars, un meurt. *Pas de ganglion inguinal*. Petit ganglion sous-lombaire. *Très gros ganglions trachéo-bronchiques*. Quelques granulations sur la rate.

Le 12 avril, un meurt. Gros ganglion inguinal et sous-lombaire. *Pas d'autres lésions*.

EXPÉRIENCE III. — Le 27 janvier 1928, quatre cobayes reçoivent sous la peau de la cuisse droite 1/100 de milligramme de *voile de six jours*.

Le 30 mars 1928, ils sont sacrifiés. Tous présentent des lésions de tuberculose généralisée.

Il découle de ces expériences que le cobaye inoculé sous la peau avec 1/100 de milligramme de voile de quatre jours peut, six semaines après l'inoculation, ne pas présenter de ganglion inguinal au point inoculé. Au bout de six à huit semaines, les organes ne sont pas atteints ou sont très faiblement atteints, alors que les animaux inoculés avec la même dose de voiles âgés de six jours, ou plus âgés, présentent à la fin de cette période des lésions beaucoup plus étendues.

INOCULATION AU LAPIN DE VOILES DE QUATRE JOURS.

EXPÉRIENCE IV. — Le 16 janvier 1928, deux lapins reçoivent par la voie veineuse 1/100 de milligramme de voile de *quatre jours*.

Le 19 mars 1928, un meurt. Il présente quelques rares granulations sur les poumons. Pas d'autres lésions.

Le 1^{er} mai 1928, un second meurt avec pour toutes lésions, quelques tubercules pulmonaires isolés.

EXPÉRIENCE V. — Le 21 janvier 1928, deux lapins reçoivent par la voie veineuse 1/100 de milligramme de voile de *quatre jours*.

Les 11 et 20 avril 1928, ces animaux meurent; granulations peu nombreuses sur les poumons. Pas d'autres lésions.

EXPÉRIENCE VI. — Le 27 janvier 1928, deux lapins reçoivent par la voie veineuse 1/100 de milligramme. Bov. Vallée (*voile de six jours*).

Ils meurent les 19 et 24 mars avec de nombreux tubercules sur les poumons, les reins et la rate.

Ainsi la dose de 1/100 de milligramme de voiles jeunes (souche Bovine Vallée), inoculée au lapin par la voie veineuse, ne détermine chez cet animal, au bout de deux à trois mois, que des granulations disséminées sur les poumons, alors que la même dose de la même souche, en culture âgée de plus de six jours, tue cet animal dans le même laps de temps avec des lésions pulmonaires confluentes et des lésions aux autres organes.

ETUDE COMPARÉE DE LA VIRULENCE DES VOILES FINS
ET DES VOILES ÉPAIS.

S. A. Pétroff a prétendu que le bacille bilié de Calmette et Guérin pouvait être dissocié en deux types :

Un *type R* (*rough*) qui donne, sur le milieu de cet auteur, des colonies écailleuses plissées, épaisses, non virulentes pour le cobaye, et un *type S* (*smooth*), qui produit des colonies fines, lisses et qui seraient pathogènes pour le cobaye.

Aucun expérimentateur n'a jusqu'à présent réussi, malgré de nombreuses tentatives, à confirmer les assertions de Pétroff. Plusieurs d'entre eux, comme M^{me} Piasecka-Zeyland, ont pu dissocier le BCG en colonies écailleuses et en colonies lisses. Mais aucun n'a constaté que les colonies du *type S* ont un pouvoir pathogène quelconque pour le cobaye.

Lorsque nous avons observé que la souche Bov. Vallée pouvait se développer sur le milieu de Sauton, soit en voile fine lisse, soit en voile épais, écaillé et plissé, nous avons pensé qu'il serait intéressant de rechercher si ces deux aspects des voiles correspondent à des virulences différentes des bacilles qui les composent.

EXPÉRIENCE VII. — Le 28 novembre 1928, deux cobayes sont inoculés sous la peau avec 1/10 de milligramme de voile épais de Bov. Vallée (culture de cinq jours) ayant subi 11 passages successifs tous les quatre jours ; 2 avec 1/100 de milligramme et 2 avec 1/1.000 de milligramme.

Les mêmes inoculations sont répétées aux mêmes doses et chez le même nombre de cobayes avec un voile fin de Bov. Vallée (culture de cinq jours) ayant subi 11 passages successifs tous les quatre jours.

Doses de 1/10 de milligramme : 1° Voile épais. Un cobaye meurt le 3 janvier 1929. Petit ganglion inguinal au point d'inoculation et petit ganglion sous-lombaire du même côté. Pas d'autres lésions.

Le second cobaye est sacrifié le 21 février 1929. Aucun ganglion au point d'inoculation. Petit ganglion sous-lombaire du même côté. Pas d'autres lésions.

2° Voile fin. Deux cobayes sacrifiés le 3 janvier 1929. Ils n'ont pas de ganglions inguinaux et sous-lombaires. Ganglions trachéo-bronchiques légèrement hypertrophiés.

Doses de 1/100 de milligramme : 1° Voile épais. Les deux cobayes ont survécu. Sacrifiés au bout d'un an, ils ne présentaient aucune lésion des ganglions ou des organes.

2° Voile fin. Un meurt le 7 janvier 1929 ; aucune lésion ganglionnaire. Un meurt le 26 janvier 1929 ; il présente un petit ganglion inguinal au point d'inoculation, non caséux, contenant quelques bacilles de Koch. Pas d'autres lésions.

Doses de 1/1.000 de milligramme : 1° Voile épais. Un meurt le 13 janvier 1929. Petit ganglion (grain de blé) au point d'inoculation et petit ganglion sous-lombaire du même côté ; ganglions trachéo-bronchiques hypertrophiés. Recherche des bacilles de Koch dans ces derniers : négative. L'autre cobaye, sacrifié au bout d'un an, ne présente aucune lésion.

2° Voile fin. Un cobaye est sacrifié le 1^{er} février 1926. Petit ganglion inguinal et sous-lombaire du même côté. Ganglions trachéo-bronchiques hypertrophiés. Recherche des bacilles de Koch : négative. Un meurt le 12 mars 1929. Pas de lésions ganglionnaires, ni viscérales.

EXPÉRIENCE VIII. — Deux lapins ont reçu par la voie veineuse 1/1.000 de milligramme de voile épais de Bov. Vallée (culture de quatre jours), ayant subi 11 passages successifs tous les quatre jours.

Les mêmes inoculations sont répétées avec des voiles fins de même origine. Les lapins sacrifiés deux mois après l'inoculation ne présentaient que quelques rares granulations sur chaque poumon.

Ces expériences n'ont donc révélé aucune différence de virulence entre les voiles fins et les voiles épais.

II. — Production de tuberculine.

Nous avons d'abord cherché si les bacilles de Koch au *quatrième jour* de leur développement contenaient déjà de la tuberculine.

EXPÉRIENCE IX. — Le 13 janvier 1928, deux lapins, inoculés le 14 septembre 1927 avec 1/1.000 de milligramme de Bov. Vallée, reçoivent dans la veine 1 cent. cube d'une émulsion de bacilles jeunes (voile de *quatre jours*).

Après cette inoculation, l'un a réagi de 1°; l'autre de 1°5.

Les bacilles âgés de quatre jours, développés en voile sur milieu de Sauton contiennent donc de la tuberculine.

Est-ce que cette tuberculine a déjà diffusé dans le liquide de culture à ce moment?

EXPÉRIENCE X. — Le 13 janvier 1928, deux lapins, inoculés le 14 septembre 1927 avec 1/1.000 de milligramme de Bov. Vallée, reçoivent dans la veine 1 cent. cube du liquide de culture.

Cette inoculation n'a provoqué chez eux aucune ascension thermique.

Au quatrième jour de leur développement en voile sur milieu synthétique de Sauton, la tuberculine présente dans les bacilles n'a pas encore diffusé dans le liquide de culture.

III. — Toxicité.

Dans un travail récent, nous avons montré que les cires et les graisses du bacille tuberculeux, extraites par l'acétone, sont toxiques pour le lapin en injections sous-cutanées et qu'on peut préserver cet animal contre cette intoxication par des injections d'antigène méthylique.

Ces résultats permettaient de supposer que les bacilles âgés de quatre jours, chez lesquels les substances ciro-graisseuses sont incomplètement formées, sont moins toxiques que les bacilles âgés.

Pour nous en rendre compte, nous avons d'abord cherché à déterminer la dose de bacilles tuberculeux (souche bovine Vallée

virulente), stérilisés à 115°, qui tue le lapin à coup sûr par injection intraveineuse.

Tous les lapins qui reçoivent 15 centigrammes de bacilles tués meurent dans un délai de dix à vingt-cinq jours. Dans la période qui suit l'injection, ils diminuent rapidement de poids, prennent un aspect cachectique, puis succombent avec des lésions pulmonaires se traduisant par une pneumonie marbrée, avec parfois un exsudat pleural.

Cette dose mortelle une fois fixée, nous avons répété ces inoculations de bacilles tués au lapin, à la même dose, avec des bacilles âgés de *quatre jours*, développés sur milieu de Sauton.

EXPÉRIENCE XI. — Le 3 octobre, 4 lapins ont reçu dans la veine 15 centigrammes de bacilles morts (souche bovine Vallée), voiles jeunes de *quatre jours*.

Deux sont morts le 2 et le 15 novembre avec une légère congestion des poumons, mais sans pneumonie marbrée.

Un est mort de diarrhée, sans lésions pulmonaires et sans perte de poids. L'autre a survécu.

Ces expériences démontrent que la toxicité des bacilles jeunes est sensiblement moindre que celle des cultures d'un mois.

IV. — Phénomène de Koch.

Il fallait enfin se rendre compte si les bacilles jeunes sont capables de provoquer l'apparition d'un phénomène de Koch typique.

EXPÉRIENCE XII. — Trois cobayes, tuberculisés depuis quatre semaines par injection sous-cutanée de 1/100 de milligramme de bovine Vallée, reçoivent dans le flanc, par injection *intradermique*, 5 milligrammes de voiles de *quatre jours* de bovine Vallée développés sur milieu de Sauton. Tous les trois ont présenté un phénomène de Koch typique.

Les bacilles jeunes sont donc capables de provoquer la formation du phénomène de Koch comme les bacilles de cultures plus âgées.

V. — Sensibilisation à la tuberculine.

Nous nous sommes également demandé si les bacilles jeunes, au quatrième jour de leur développement, sensibilisent les animaux à la tuberculine comme les bacilles des cultures plus âgées.

Dans l'expérience VII citée précédemment, les cobayes inoculés par la voie sous-cutanée avec 1/10 de milligramme, 1/100 et 1/1.000 de milligramme de voiles fins et de voiles épais, âgés de cinq jours, ont été éprouvés par injection intradermique de 0 c. c. 1 de tuberculine brute diluée au 1/10, quatre semaines après leur inoculation.

Les résultats de ces épreuves ont été les suivants :

Les deux cobayes inoculés avec 1/10 de milligramme de voiles fins ont présenté une réaction nécrotique; avec 1/100 de milligramme, un léger épaissement et une réaction papuleuse; avec 1/1.000 de milligramme, une réaction négative et un léger épaissement.

Les deux cobayes inoculés avec 1/10 et 1/100 de milligramme de voiles épais, léger épaissement; avec 1/1.000 de milligramme, réaction négative.

Avec 1/1.000 de milligramme de bacilles jeunes (dose qui sensibilise à coup sûr les cobayes inoculés, lorsqu'il s'agit de cultures âgées), les cobayes, au bout de six semaines, ont été irrégulièrement sensibilisés à la tuberculine.

La même expérience de sensibilisation a été faite chez le lapin.

EXPÉRIENCE XIII. — Le 8 janvier 1929, 5 lapins reçoivent dans la veine 1/100 de milligramme de voiles de *quatre jours*. Le 26 février 1929, ils ont été éprouvés par injection intraveineuse de 0 c. c. 1 de tuberculine brute au 1/10.

Ils n'ont présenté aucune ascension thermique.

Ces deux lapins n'ont donc pas été sensibilisés à la tuberculine au bout de six semaines par inoculation intraveineuse de 1/100 de milligramme de bacilles âgés de *quatre jours*.

VI. — Pouvoir antigène des voiles jeunes.

Pour préciser encore mieux les caractères biologiques des voiles de *quatre jours*, nous avons cherché s'ils avaient un pouvoir antigène plus élevé que les bacilles plus âgés.

EXPÉRIENCE XIV. — Le 4 mai 1928, 1 centigramme de bacilles vivants (souche bovine Vallée), extraits d'un voile âgé de *quatre jours* sur milieu de Sauton, sont inoculés dans la veine de 3 lapins A4, A5, A6.

Les animaux sont saignés et leur sérum est titré au point de vue de sa teneur en anticorps.

Le 11 mai, le sérum de A4 contient 60 unités d'anticorps.

Le 11 mai, le sérum de A5 contient 60 unités d'anticorps.

Le 11 mai, le sérum de A6 contient 40 unités d'anticorps.

Le 18 mai, le sérum de A4 contient 120 unités d'anticorps.

Le 18 mai, le sérum de A5 contient 60 unités d'anticorps.

Le 18 mai, le sérum de A6 contient 40 unités d'anticorps.

EXPÉRIENCE XV. — Le 4 mai 1928, 1 centigramme de bacilles vivants (souche bovine Vallée), extraits d'un voile âgé de *seize jours* sur milieu de Sauton, sont inoculés dans la veine de 3 lapins A1, A2, A3.

Le 11 mai, le sérum de A1 contient 80 unités d'anticorps.

Le 11 mai, le sérum de A2 contient 40 unités d'anticorps.

Le 11 mai, le sérum de A3 contient 40 unités d'anticorps.

Le 18 mai, le sérum de A1 contient 40 unités d'anticorps.

Le 18 mai, le sérum de A2 contient 20 unités d'anticorps.

Le 18 mai, le sérum de A3 contient 40 unités d'anticorps.

Il ressort de la comparaison de ces chiffres que l'inoculation des bacilles jeunes au lapin provoque, dans le sérum, la formation d'une quantité d'anticorps plus élevée que l'inoculation des bacilles plus âgés.

Chez le cheval, nous avons obtenu aussi, par inoculation intraveineuse de bacilles jeunes vivants, une abondante formation d'anticorps :

EXPÉRIENCE XVI. — Un cheval reçoit, le 4 mai 1928, par injection intraveineuse, 30 milligrammes de bacilles humains (voiles âgés de *quatre jours* sur milieu de Sauton), chauffés une heure à 65°.

Les injections sont répétées le 11 et le 19 mai et le 1^{er} juin.

Le 11 mai, le sérum de ce cheval contient 600 unités d'anticorps.

Le 19 mai, le sérum de ce cheval contient plus de 1.400 unités d'anticorps.

Le 1^{er} juin, le sérum de ce cheval contient 8.000 unités d'anticorps.

VII. — Propriétés immunisantes.

On sait que les divers essais de vaccination préventive faits avec les bacilles tuberculeux tués par des agents chimiques ou physiques ont échoué jusqu'à présent. Certains expérimentateurs ont attribué ces échecs, soit à la forte proportion de substances ciro-graisseuses contenues dans ces bacilles et qui s'opposent à la résorption de ceux-ci par l'organisme, soit aux altérations des protéines microbiennes par l'effet des substances chimiques employées pour dégraisser ou pour modifier les corps bacillaires. Nous avons donc des raisons de nous demander si les bacilles jeunes, vivants, stérilisés par la chaleur ou provenant de souches avirulentes telles que le BCG, ne jouissent pas, en raison de la faible quantité de substances ciro-graisseuses qu'ils contiennent, de propriétés immunisantes plus prononcées que les bacilles ayant atteint leur développement complet.

EXPÉRIENCE XVII. — Deux lots de 4 lapins chacun reçoivent par injection intraveineuse, à quatre jours d'intervalle, le 30 juin et le 4 juillet 1928, 5 centigrammes de bacilles tuberculeux (souche bovine Vallée) chauffés une heure à 70°. Pour le premier lot : cultures âgées d'un mois; pour le second : voiles jeunes développés sur milieu de Sauton et âgés de *quatre jours*.

Tous ces animaux, en même temps que deux témoins, ont été éprouvés un mois après par inoculation intraveineuse de 1/1.000 de milligramme de bovine Vallée.

Les lapins des deux lots et les témoins sont morts à peu près dans les mêmes délais et avec des lésions ayant sensiblement la même gravité et le même développement : gros tubercules assez nombreux sur les poumons et quelques lésions rénales.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons recherché l'action immunisante des voiles jeunes vivants, de la souche bovine Vallée, qui, à la dose de 1/100 de milligramme, ne tuberculisent pas le lapin.

EXPÉRIENCE XVIII. — Cinq lapins reçoivent le 8 janvier 1929, par injection intraveineuse, 1/100 de milligramme de la souche bovine Vallée (voile de *quatre jours* sur milieu de Sauton).

Le 12 février, ils sont éprouvés ainsi que deux témoins par injection intraveineuse de 1/1.000 de milligramme de la souche bovine Vallée.

Le 27 février et le 23 mars, 2 lapins meurent prématurément sans lésions.

Le 30 avril, les 3 survivants sont sacrifiés ainsi que les témoins. L'un d'eux présente, comme les témoins, des lésions pulmonaires confluentes et des lésions rénales. Les deux autres n'ont que deux ou trois nodules pulmonaires espacés.

Dans une troisième série d'expériences, nous avons comparé le pouvoir immunisant du bacille bilié de Calmette et Guérin à l'âge d'un mois et à l'âge de quatre jours.

EXPÉRIENCE XIX. — Cinq lapins ont reçu dans la veine 15 milligrammes de BCG provenant d'un voile âgé d'un mois sur milieu synthétique de Sauton (360^e passage sur milieu bilié); 5 autres lapins ont reçu dans la veine la même quantité de bacilles BCG, ayant subi le même nombre de passages, mais prélevés sur milieu de Sauton au quatrième jour du développement du voile.

Tous ces animaux, ainsi que 2 témoins, ont été éprouvés un mois après par injection intraveineuse de 1/1.000 de milligramme de bacilles tuberculeux (souche bovine Vallée).

Les 2 lapins témoins sont morts trois mois après l'inoculation d'épreuve avec des lésions pulmonaires confluentes et de nombreux tubercules sur les reins.

Dans le lot des animaux vaccinés avec la culture BCG d'un mois, les lapins qui sont morts dans les mêmes délais que les témoins ou qui leur ont survécu présentaient de gros tubercules pulmonaires isolés et de rares granulations sur les reins.

Dans le lot des animaux vaccinés avec les voiles de BCG âgés de quatre jours, les lésions étaient nettement moins prononcées : à peine 4 ou 5 petits tubercules sur chaque poumon et aucune lésion rénale, sauf chez un lapin qui avait deux petites granulations sur chaque rein.

Il ressort de ces expériences que les cultures jeunes de bacilles tuberculeux, stérilisées par chauffage, ne possèdent aucun pouvoir immunisant.

Les mêmes cultures *vivantes*, à la dose de 1/100 de milligramme, paraissent conférer au lapin une résistance relative.

Les voiles jeunes de BCG donnent au lapin une résistance aux infections d'épreuve beaucoup plus marquée que celle qu'on obtient habituellement par l'injection de cultures âgées de trente jours.

Conclusions.

Dans les cinq premiers jours de leur développement, les voiles jeunes de bacilles tuberculeux, obtenus sur milieu synthétique de Sauton, présentent une virulence très inférieure à celle des cultures âgées de trois à quatre semaines.

Inoculés à la dose de 1/100 de milligramme au cobaye par la voie sous-cutanée, et au lapin par la voie veineuse, ils provoquent, chez le premier, l'apparition de lésions surtout ganglionnaires, et, chez le second, quelques granulations localisées aux poumons.

Les voiles *fins* et les voiles *épais*, âgés de cinq jours, présentent la même virulence pour le cobaye et le lapin.

Les bacilles âgés de quatre jours, développés en voile sur milieu de Sauton, contiennent de la tuberculine, mais, à ce moment, elle n'a pas encore diffusé dans le liquide de culture. Ils sont moins toxiques pour le lapin que les bacilles âgés de quatre semaines, mais ils sont capables de déterminer, par inoculation au cobaye tuberculeux, la formation du phénomène de Koch.

Leur pouvoir sensibilisant à la tuberculine est inférieur à celui des bacilles âgés, mais leur pouvoir antigène *in vivo* est plus élevé.

Les bacilles jeunes tués par la chaleur, inoculés au lapin par la voie veineuse, se comportent comme les cultures âgées stérilisées, et n'ont pour cet animal aucun pouvoir immunisant.

L'infection légère provoquée chez le lapin par l'inoculation de bacilles jeunes vivants donne à cet animal une certaine résistance à l'infection d'épreuve virulente.

Les voiles jeunes de bacilles BCG, développés sur milieu de Sauton, paraissent jouir d'un pouvoir immunisant supérieur à celui des bacilles âgés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MARMOREK. *Acad. Méd. Paris*, 1903, **50**, 332, 465, 480; *Berl. Med. Klin.*, 1906, **3**, 58; *Berl. Klin. Woch.*, 1907, **44**, 18.
- [2] A. LEGROUX et J. MAGROU. *Ces Annales*, **84**, 417.
- [3] F. BEZANÇON et A. PHILIBERT. *Soc. Etudes scientifiques sur la tuberculose*, 12 mars 1914, **32**.
- [4] A. VAUDREMER. *C. R. Soc. Biologie*, **84**, 259, 775; **85**, 1055.
- [5] L. NÈGRE, A. BOQUET et J. VALTIS. *C. R. Soc. Biologie*, **99**, 45; **101**, 544, 901; **102**, 836.

**CYCLE DE DÉVELOPPEMENT
DU BACILLE TUBERCULEUX
(*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*)
D'APRÈS L'ÉTUDE DES GERMES VIVANTS ISOLÉS**

par MORTON C. KAHN.

*(Department of Public Health and Preventive Medicine,
Cornell University. Medical College, New-York) (1).*

Depuis que Robert Koch a découvert le bacille tuberculeux et fourni la preuve qu'il est l'agent de la tuberculose, on a généralement admis que l'étude bactériologique de ce micro-organisme, en ce qui concerne sa morphologie, était définitivement terminée et que le bacille acido-résistant de Koch était la seule forme provoquant la maladie.

On trouve cependant dans la littérature un certain nombre de travaux qui semblent indiquer que le bacille tuberculeux peut ne pas être toujours présent dans les cultures ou les lésions sous sa forme bacillaire, ni au stade d'acido-résistance.

Nos récentes acquisitions sur la dissociation et la mutation des bactéries montrent que nos connaissances sur le cycle évolutif de ce microorganisme sont loin d'être complètes.

On ne peut plus considérer comme acquis que le seul moyen de reproduction du bacille tuberculeux est celui qui s'effectue par simple scission. Une impulsion particulière a été donnée à l'étude biologique du bacille tuberculeux par Calmette et ses collaborateurs, par Fontès, par Vaudiemer, par Arloing et Dufourt et plusieurs autres auteurs de l'École française qui ont établi que les cultures du bacille tuberculeux à certains stades

(1) Ce travail fait partie d'un groupe de recherches qui ont été entreprises avec le concours du *Medical Research Board of the National Tuberculosis Association*.

de leur développement, ainsi que les extraits des organes des animaux ou des organes humains, peuvent, après filtration dûment contrôlée à travers les bougies Chamberland ou les bougies de certains autres types, provoquer chez les animaux d'expérience, après inoculation, des lésions tuberculeuses.

L'infection ainsi réalisée peut se manifester, comme l'ont montré ces auteurs, sous différents aspects. Quelquefois on trouve à l'autopsie des lésions typiques de tuberculose plus ou moins généralisées décelables par l'examen macroscopique.

Plus fréquemment, si l'animal meurt, on ne trouve qu'une hypertrophie plus ou moins marquée de certains ganglions. Dans les frottis de ceux-ci on découvre généralement des bacilles acido-résistants typiques, bien que l'aspect des ganglions paraisse normal.

D'autres animaux semblent demeurer normaux pendant toute la durée de l'observation; mais, lorsqu'ils sont éprouvés à la tuberculine en concentration plus élevée que celle qu'on emploie ordinairement, ils accusent une hypersensibilité qui débute aux environs du vingt-cinquième jour après l'inoculation des filtrats et qui persiste quelques semaines.

En 1926 Calmette établissait les conclusions suivantes :

Dans certaines infections tuberculeuses sévères le passage du virus tuberculeux de la mère au fœtus pendant la gestation n'est pas si exceptionnel qu'on l'avait supposé.

L'infection transplacentaire est le plus souvent réalisée par les éléments filtrables du bacille tuberculeux que nous appelons *ultravirus tuberculeux* et qui est pathogène pour le cobaye. Le bacille de Koch classique représente un stade avancé d'évolution et probablement une forme de résistance du microorganisme.

Les travaux des auteurs français ont été partiellement confirmés par Sweany et par Mellon, mais certains autres auteurs américains, et en particulier Cooper et Pétroff, n'ont pas réussi à obtenir les mêmes résultats. Des expériences négatives sur la filtrabilité du bacille de Koch ont été publiées en Angleterre par Gloyne et ses collaborateurs.

L'opinion de Calmette, que le bacille tuberculeux acido-résistant n'est pas la seule forme que ce microorganisme présente, est confirmée par un certain nombre d'observations que l'on

trouve dans la littérature. Nos propres résultats confirment aussi en partie cette opinion.

Déjà, en 1883, Malassez et Vignal décrivaient des granulations non acido-résistantes issues de masses zoogléiques qui pouvaient se transformer ultérieurement en bacilles acido-résistants.

Treize ans après, Semmer décrivait des éléments globulaires issus des bâtonnets, et des formes renflées qui se transformaient en bacilles acido-résistants. D'autre part, Schuermayer, en 1898, considérait que le bacille de la tuberculose et le micro-organisme de l'actinomyose étaient très rapprochés en ce qui concerne leur mode de multiplication.

Arrigo, en 1900, décrivait plusieurs transformations morphologiques importantes des bacilles en granules et, inversement, de ceux-ci en bacilles. Ernst, en 1902, pensait que plusieurs espèces de bactéries présentent dans leur protoplasme de fins granules qui fonctionneraient comme centres de germination et il considérait que le bacille tuberculeux ne fait pas exception à cette règle.

Spengler, en 1905, décrivait une forme granulaire intéressante du bacille, le « splitter », qu'on trouve dans certaines souches, particulièrement dans les souches bovines. Ces granules sont fortement acido-résistants.

Les travaux de Much en 1907 ont suscité un intérêt considérable et suggéré l'idée de chercher d'autres formes que les formes acido-résistantes. D'après les travaux de ce savant, il est difficile de trouver des bacilles acido-résistants dans les abcès froids, tandis que les animaux témoins inoculés avec le pus qui en provient donnent dans une proportion très élevée de résultats positifs. D'autre part, Much a démontré que les bacilles acido-résistants disparaissent et réapparaissent dans les crachats de semaine en semaine et, dans l'intervalle, la coloration au Ziehl-Nielsen ne révèle pas leur présence, tandis que par la coloration de Gram on trouve, à côté de bâtonnets très fins, des granulations isolées ou en petits amas. Ces granulations s'observent souvent à côté des bacilles, ce qui fait supposer qu'elles en dérivent. Très souvent elles apparaissent isolées ou groupées comme des amas de grains de poussière.

Dans les vieilles cultures, Much trouve toujours des grains acido-résistants disposés en chapelets et qui paraissent entourés

par une sorte de capsule en forme de bâtonnet. Il démontre en outre que si ces granulations ne sont pas entourées de capsule elles perdent leurs propriétés d'acido-résistance.

Much a essayé de mettre en évidence les propriétés pathogènes de ces granulations en inoculant des émulsions de tubercules dans lesquels on trouvait seulement la forme granulaire sans qu'on puisse, après des recherches minutieuses faites par trois observateurs différents, y déceler des bacilles acido-résistants.

Plusieurs autres auteurs ont observé des variations de la forme acido-résistante du bacille, par exemple : Maher, Knoll, Krylow, Reenstierna, Karwacki, Kirchenstein, Sweany, etc.

La plupart ont insisté sur l'existence de types granulaires et non acido-résistants, mais ils interprètent différemment les formes et leur place dans un cycle évolutif probable.

Bergel, au contraire, considère les granulations et les bacilles non acido-résistants comme des formes de dégénérescence du bacille tuberculeux.

Un des travaux les plus récents sur les modifications morphologiques du microorganisme de Koch est celui de Sweany, qui a observé dans un abcès tuberculeux de l'oreille des granulations d'un aspect particulier, qui se sont, par la suite, transformées en bacilles acido-résistants.

Cet auteur a affirmé que, dans certains stades, les granulations peuvent se transformer en bacilles nettement mobiles qui ne sont pas acido-résistants. Nous n'avons pas observé ces formes mobiles au cours de nos recherches.

Sweany insiste sur le pouvoir pathogène de ce stade granulaire. De très petites doses de granules provoquent une tuberculose chronique et atypique, tandis que l'inoculation de grosses doses provoque une infection typique et active.

EXPÉRIENCES.

Les observations des auteurs précités et celles de plusieurs autres ont été faites, soit par l'étude de préparations colorées, soit par celle de préparations en goutte pendante obtenues en utilisant des produits tuberculeux ou des cultures. Bien que les observations faites sur des préparations colorées ou autres

contenant beaucoup de bacilles soient très intéressantes et suggestives, l'étude du cycle évolutif y est rendue particulièrement difficile du fait que les types étudiés ne sont pas au même stade de leur développement.

Lorsqu'on examine des préparations contenant plusieurs bactéries vivantes, il est difficile, sinon impossible, de suivre constamment le développement d'un seul individu et si, pour une seconde, on cesse de fixer le champ microscopique, on ne peut presque jamais être sûr de retrouver le bacille que l'on observait. Pour écarter cette difficulté, nous avons fait nos observations sur plus de 200 préparations d'un seul bacille et sur un nombre égal de préparations contenant des petits groupes de 3, 4 et 6 bacilles.

Chacune des unités bacillaires a été déposée, d'après une technique que nous décrirons plus loin, sur une gouttelette séparée, dans des conditions qui permettent le développement du bacille et qui maintiennent sa vitalité pendant quelques jours, souvent pendant plusieurs semaines.

Contrairement aux autres microbes pathogènes tels que le bacille typhique, dont le cycle évolutif se réalise souvent dans les vingt-quatre heures, nous avons constaté, dans nos expériences, que d'un bacille à l'autre les étapes successives de la maturation s'accomplissent beaucoup plus lentement, dans un espace de temps qui varie entre huit et douze jours, et quelquefois le bacille n'atteint sa maturité qu'après vingt-six jours. Il est donc nécessaire de faire des observations prolongées.

La souche de bacilles tuberculeux qui a servi à ces recherches fut le n° H 37 du laboratoire de Saranac : bacille humain provenant de l'Association Nationale contre la tuberculose

La culture originale de cet organisme était entretenue par des passages sur le milieu liquide synthétique sans protéines de Long. On a toujours obtenu des cultures luxuriantes et nous avons trouvé ce milieu égal, sinon supérieur, aux milieux à l'œuf ou au bouillon glycérimé pour entretenir la culture.

Le milieu de Long est composé de glycérine, asparagine, citrate d'ammoniaque, phosphate de potasse, sulfate de magnésie, citrate de fer ammoniacal, carbonate de soude, chlorure de sodium et eau distillée. L'alcalinité du milieu doit être $pH = 7,4$.

Le milieu utilisé pour la culture de cellules isolées ou en petits amas était le même que le précédent avec addition de 0,2 p. 100 de gélose et 1,5 p. 100 de gélatine. Ces dernières substances étaient ajoutées pour empêcher les petits gouttelettes de s'étendre et de se mélanger avec l'eau de condensation déposée sur la face inférieure de la lamelle. C'est grâce à ce milieu ainsi modifié et rendu visqueux qu'il nous a été possible de maintenir la gouttelette dans des conditions parfaites pour une période de temps assez longue.

Jusqu'à présent, on avait utilisé pour la culture de cellules isolées des milieux entièrement liquides, mais ceux-ci ne nous ont pas paru convenir à la réalisation de notre étude.

Quatre jours avant d'essayer d'isoler une seule cellule, une petite quantité de culture jeune, provenant de la culture-mère, étaitensemencée *en profondeur* dans le milieu liquide, additionné de gélose et de gélatine, que nous avons décrit plus haut. De cette manière il nous fut possible d'obtenir un certain nombre de bacilles libres sans avoir à agiter la masse de culture-mère.

Les gouttelettes étaient déposées sur la face inférieure d'une lamelle n° 1, très soigneusement nettoyée et stérilisée. Cette lamelle était placée sur la cellule de Chambers, qui est une boîte oblongue en verre, ouverte en haut et sur un côté. L'isolement des microbes isolés et en petits amas fut possible grâce à l'emploi du micromanipulateur de Chambers, appareil conçu de telle façon qu'il permet la manœuvre des micropipettes sur trois plans dans le champ optique du microscope.

Le diamètre intérieur des pipettes était d'environ 1,5 micron et celles-ci étaient assez étroites pour laisser sourdre des gouttes très petites qui, souvent, ne contenaient qu'un seul microbe.

Après avoir déposé sur la lamelle IV gouttes contenant un seul bacille, ou des groupes de bacilles ne dépassant pas 6 unités, celle-ci était retirée de la cellule de Chambers (cellule en verre) et déposée sur une lame creuse. La lamelle était ensuite scellée sur place avec un mélange de vaseline paraffinée chaude qu'on avait à la portée de la main.

Pour éviter le dessèchement des gouttelettes, on dépose dans la profondeur de la lame creuse une goutte de gélose stérile à 1 p. 100 avant de sceller la lamelle.

Les gouttelettes sont ensuite examinées au microscope avec un objectif à immersion de 2 millimètres et un oculaire grossissant 15 fois et on dessine avec attention les cellules isolées ou les petits amas que contient chaque gouttelette.

Les lames à chambre humide sont déposées dans des boîtes de Pétri contenant au fond du papier filtre humecté, puis mises à l'étuve à 37°5. Les gouttelettes sont assez petites et superficielles pour permettre leur visibilité complète de tous les côtés; par conséquent il est impossible de passer à côté même d'une granulation ou d'un microbe contenu dans la gouttelette. Un grand nombre de gouttelettes ont été examinées sans qu'il nous ait été possible de déceler la moindre contamination.

Nous avons examiné un certain nombre des lames ainsi préparées sur la platine du microscope incubateur à 37° et il nous apparut aussitôt évident qu'il n'y avait pas de changement des bacilles isolés pendant les premières heures, excepté parfois l'apparition de granulations centrales, polaires, ou bipolaires. Ensuite des examens successifs ont été faits toutes les vingt-quatre heures.

Pétroff et d'autres auteurs de traités de bactériologie ont posé en principe que la multiplication du bacille tuberculeux s'effectue par scission. De nombreux chercheurs, parmi lesquels Metchnikoff, Magrou, etc., ont pourtant décrit des formes ramifiées; mais S. A. Pétroff considère que celles-ci sont formées par la juxtaposition de 2 bacilles isolés et déclare qu'il n'a jamais observé de véritables formes ramifiées du bacille de Koch.

L'avis de S. A. Pétroff est en contradiction avec notre propre expérience, car plusieurs fois nous avons eu l'occasion d'observer un bacille naissant d'une granulation intrabacillaire qui, finalement, se séparait de l'élément générateur, sous la forme d'un bacille considérablement plus court et plus fin.

Ces cas, cependant, sont exceptionnels, ainsi que ceux dans lesquels on voit un bacille court naître entre les deux moitiés d'une granulation; lorsque ces deux moitiés se divisent, elles s'étirent et finalement forment deux petits bâtonnets avec des corpuscules polaires.

Dans les conditions expérimentales que nous avons déjà

mentionnées, et avec notre souche, le cycle évolutif le plus souvent rencontré fut le suivant :

Après une incubation de quelques heures dans les micro-gouttelettes, on voit se former dans le bacille homogène isolé non coloré certaines zones qui apparaissent, en lumière réfléchie, d'un contour plus sombre que le protoplasme bacillaire environnant. Les zones sombres nous semblent être la partie plus fortement colorée qui apparaît noir et rouge foncé lorsque le bacille tuberculeux est coloré par la méthode de Krylow avec la fuchsine phéniquée et le violet de méthyle phéniqué. Ces zones sont situées soit au centre, soit dans la partie subterminale ou aux deux pôles.

On trouve dans la plupart des cas deux ou trois de ces zones, quelquefois 10; une seule fois nous en avons observé 16 dans un seul bâtonnet.

Environ vingt-quatre ou soixante-douze heures après l'ensemencement, et souvent plus tard, on aperçoit des lignes de séparation, mais celles-ci paraissent, en ce qui concerne leur position, indépendantes des zones sombres déjà formées, car nous avons souvent remarqué que, dans un bâtonnet présentant des corpuscules bipolaires, se forment 4 zones de séparation dont 2 ne sont pas sombres. Ainsi que nous allons le démontrer, ce type particulier de séparation n'est pas une simple scission dans laquelle un bâtonnet se divise sur une ligne plus ou moins transversale et centrale en deux moitiés qui peuvent se développer et se rediviser à leur tour. Il s'agit ici d'un processus de division qui donne naissance le plus souvent à 3 ou 4 unités séparées qui prennent la forme des corpuscules ovales. Le nombre des unités ainsi formées dépend de la dimension du bacille. Dans ce stade les corps coccoïdes sont acido-résistants et ressemblent aux « splitters » décrits par Spengler, mais quelquefois on rencontre des formes globoides non acido-résistantes qui sont entourées d'une zone mince acido-résistante. Ce sont, croyons-nous, les parties des bâtonnets qui présentaient des zones sombres. Les éléments coccoïdes ainsi formés n'évoluent pas directement en bacilles adultes; beaucoup d'entre eux se divisent par une simple ligne de séparation plus ou moins centrale. Ainsi se constituent des types ayant l'apparence de diplocoques ou de pneumocoques très petits.

Ces formes diplococciques apparaissent vingt-quatre ou quatre-vingt-seize heures au plus tard après le processus de séparation. Dans ce stade particulier du cycle évolutif, elles ont, mesurées au micromètre de Filar, un diamètre de 0,11 à 0,38 microns. La subdivision de ces corps se continue assez rapidement, de sorte que, vingt-quatre heures après son ensemencement, la micro-gouttelette contient déjà en abondance de très fins cocci ou diplocoques, trop petits pour être mesurés, dont quelques-uns se groupent en chapelets courts. Les formes qu'on trouve à ce stade de développement ne sont pas acido-résistantes et il est possible que ce soient celles que Much a décrites. Si on prolonge l'incubation d'un jour ou plus, elles montrent une tendance nette à s'agglutiner. Bien que plusieurs des granules soient libres, on voit se former des amas et les particules qui les composent deviennent de plus en plus petites, de sorte que, si on prolonge l'incubation de vingt-quatre à quarante-huit heures, on ne trouve plus dans les micro-gouttelettes que des petits amas de particules très fines, en poussière. Les éléments de ces groupes sont si petits qu'il nous a été impossible de les mesurer avec le micromètre. On les trouve plus distincts à la périphérie des agglutinats. Quelques-uns sont à la limite de la visibilité. Il est possible que certains de ces éléments soient assez petits pour traverser les filtres de porcelaine, mais nos expériences sur ce point ne sont pas encore terminées.

Much dit avoir observé, dans les produits tuberculeux, des amas de particules poussiéreux. Il est possible qu'il s'agisse de formes similaires, sinon identiques, à celle que nous venons de décrire.

Ces amas restent inchangés pendant des périodes de temps variables (vingt-quatre, quarante-huit heures ou plus). On peut cependant voir naître à leur périphérie les plus délicats bâtonnets qu'on puisse imaginer. Au début ces bâtonnets sont tellement grêles qu'on les identifie difficilement. Ils poussent avec une rapidité variable jusqu'au moment où ils deviennent des bacilles adultes acido-résistants. Quelques-uns de ces fins bâtonnets se séparent de l'amas où ils ont pris naissance et se développent à une certaine distance de celui-ci.

Cependant le plus grand nombre d'entre eux ne s'en écartent pas et y complètent leur développement.

La question de savoir si ces micro-bacilles forment des granulations individuelles ou si les granules s'étirent en filaments fins reste jusqu'à présent sans réponse et nécessite une démonstration plus précise.

Nous avions jadis pensé que ces bacilles jeunes peuvent ultérieurement se diviser par segmentation directe, car nous avons clairement observé des formes ramifiées et des formes incurvées. Mais, dans nos récentes recherches, nous n'avons pas pu constater l'existence d'un tel processus, même lorsque nous avons fait des cultures-filles avec la micro-pipette, en partant de la masse germinative pulvérulente.

Dans les stades jeunes de leur développement, ces bâtonnets prennent à la lumière réfléchie une couleur blanc jaunâtre. Après quatre à cinq jours, ils présentent, dans les mêmes conditions d'éclairement, une teinte de couleur verdâtre, semblable à celle des bacilles tuberculeux adultes.

Cette manière différente de se comporter vis-à-vis de la lumière réfléchie est peut-être due à la formation de la couche acido-résistante sur les éléments plus anciens. L'étude des préparations colorées semble bien justifier cette hypothèse.

Lorsqu'on colore des préparations faites avec des amas contenant un certain nombre de bacilles jeunes, on trouve un nombre considérable de bacilles non acido-résistants, et parmi eux d'autres bacilles présentant la teinte des mûres, plus roses que les bacilles non acido-résistants, et moins rouges que les formes franchement acido-résistantes.

Les formes non acido-résistantes sont de dimensions très variables, depuis celles qui sont trop petites pour être mesurées jusqu'à celles qui mesurent de 0,3 à 1,2 μ . Les plus longs bacilles adultes mesurent de 1,2 à 5,0 μ . C'est Marmorek qui, le premier, en 1900, a appelé l'attention sur les formes non acido-résistantes et qui a supposé que celles-ci représentaient des formes jeunes. A. Vaudremer et S. A. Pétroff sont d'avis que les bacilles non acido-résistants se rencontrent plus souvent lorsque le milieu de culture n'est pas favorable, ou ne contient pas de glycérine. Dans nos micro-cultures nous avons observé au contraire qu'ils étaient le plus nombreux à un certain stade de leur développement lorsque le milieu de culture était favorable et contenait de la glycérine. Mais ils peuvent

aussi bien se trouver en grand nombre dans les milieux pauvres qui ne contiennent pas les substances nutritives nécessaires pour compléter leur évolution.

Une autre souche de bacilles tuberculeux fraîchement isolée d'urines tuberculeuses a présenté le même cycle évolutif que celui que nous avons décrit pour la souche H 37.

Il est fort possible que le cycle évolutif que nous avons décrit ici soit uniquement dû à la méthode artificielle de culture que nous avons employée et qu'il n'existe pas dans le corps animal. Nous ne savons encore rien de précis à ce sujet. Cependant nous devons rappeler qu'un certain nombre d'auteurs, et particulièrement Much, ont observé des éléments semblables à ceux que nous avons décrits dans des produits pathologiques et, comme nous l'avons fait remarquer plus haut, l'absence de bacilles acido-résistants colorables ne doit pas exclure la possibilité de l'existence d'une infection tuberculeuse. L'importance de l'inoculation à l'animal se trouve ainsi accrue.

Pour plus de détails sur la technique que nous avons employée et sur les constatations que nous avons pu faire, nous prions le lecteur de se référer à notre article de l'*American Review of Tuberculosis*, vol. XX, n° 2, août 1929.

RECHERCHES SUR LA PRÉSENCE ET LA RÉPARTITION DU TITANE DANS LES PLANTES CRYPTOGAMES

par M. GABRIEL BERTRAND et M^{me} VORONCA-SPIRT.

Nous avons montré précédemment que le titane se rencontre dans toutes les plantes phanérogames, qu'il y en a même généralement assez pour qu'on puisse le doser dans les divers organes. Ce sont les parties vertes et surtout les feuilles qui sont les plus riches en métal. Dans la partie aérienne des plantes annuelles, récoltées au moment de la floraison, la proportion de titane est voisine du milligramme par kilogramme à l'état frais (1).

Depuis, nous avons effectué un certain nombre de recherches sur des plantes appartenant aux classes des Fougères, des Algues et des Champignons, afin de savoir si le métal était partout répandu dans le règne végétal.

Des frondes de *Polypodium vulgare* C., de deux espèces de laminaires et de sept espèces de fucacées appartenant aux genres *Fucus*, *Pelvetia*, *Himanthalia*, *Ascophyllum* et *Cystosira*, ont d'abord été débarrassées par un lavage soigneux (2), comme il a été décrit au sujet des recherches antérieures, de la poussière et des particules terreuses qui pouvaient les souiller, puis

(1) Ces *Annales*, 44, 1930, p. 185-194.

(2) Il est très difficile de débarrasser certaines algues de toutes traces de matières minérales extérieures, ce qui enlève un peu de précision aux analyses. Dans un essai sur *Fucus vesiculosus*, cependant, nous avons séparé des cendres, par lavage à l'acide chlorhydrique dilué et décantation, une très petite quantité de sable dans laquelle nous avons recherché le titane après fusion au carbonate de sodium, et nous n'en avons pas trouvé. Ce résultat laisse supposer que les erreurs analytiques ne doivent pas être de nature à changer le sens de nos conclusions.

soumises à la dessiccation et analysées. Nous y avons trouvé régulièrement du titane, dans la proportion d'un à plusieurs milligrammes par kilogramme de matière fraîche, comme dans la plupart des feuilles de phanérogames déjà étudiées.

L'examen des Champignons a conduit à une observation particulière. Nous avons bien dosé environ 1/2 milligramme de titane par kilogramme de matière fraîche dans les trois hyménomycètes que nous avons pu nous procurer : le champignon de couche, le bolet comestible et la russule de Quélet, mais nous n'avons pas réussi à mettre le métal en évidence avec certitude dans la levure de boulangerie et dans l'*Aspergillus niger*.

Nous avons opéré sur 100 grammes de levure pressée, contenant 26 gr. 6 de matières sèches et 2 gr. 6 de cendres. La solution sulfurique de ces dernières, d'où le silicium avait été éliminé par l'acide fluorhydrique et qui renfermait 0 gr. 39 de phosphore à l'état de phosphates, n'a pas donné avec le peroxyde d'hydrogène une coloration jaune assez marquée pour être absolument démonstrative de la formation d'acide pertitanique. Il a bien semblé, par comparaison avec des solutions sulfuriques de titane titrées, renfermant la même quantité de phosphore, qu'il y avait une très faible coloration par le peroxyde d'hydrogène, mais celle-ci était au voisinage de la limite de perceptibilité, qui est de 0 milligr. 03 de titane lorsqu'on opère sur 50 cent. cubes. La proportion de titane contenue dans la levure pourrait donc être de l'ordre de grandeur de 1/10 de milligramme au plus par kilogramme de matière fraîche.

Pour rechercher le titane dans l'*Aspergillus*, une culture du champignon a été faite sur le liquide Raulin préparé avec du sucre candi blanc, de l'acide tartrique et des sels purs du commerce. Dix litres de ce liquide ont été répartis par portions de 250 cent. cubes dans des cuvettes en porcelaine recouvertes de couvercles de verre maintenus par des agrafes en aluminium de manière à permettre l'accès de l'air. Après stérilisation à l'autoclave et refroidissement, le liquide a étéensemencé et mis à l'étuve à 35°. On a recueilli, après quatre jours, 1 kilogr. 1/2 environ de mycélium lavé et ressuyé, contenant 145 grammes de matières sèches et 6 gr. 7 de cendres. La

recherche du titane a été entreprise sur la totalité de la récolte : nous n'avons pas obtenu de réaction positive.

	TITANE en milligrammes par kilogramme de matière		
	Fraîches	Sèches	Cendres
Champignon de couche (<i>Psall. camp.</i>)			
L.), entier	0,3	2,4	27,2
Bolet comestible (<i>Bol.edul. Fr.</i>), entier.	0,7	7,2	54,7
Russule de Quélet (<i>Russ. Quel. Fr.</i>), entière	0,54	4,8	77,1
<i>Laminaria flexicaulis</i> Le Jolis, entière	»	6,0	48,1
<i>Laminaria saccharina</i> L., entière	»	5,4	36,4
<i>Himanthalia lorea</i> L., entière	»	24,0	72,0
<i>Pelvetia canaliculata</i> L., entière	1,9	6,0	25,2
<i>Ascophyllum nodosum</i> L. pl., entière	0,9	3,0	16,0
<i>Fucus vesiculosus</i> L. pl., entière	»	9,0	35,6
<i>Fucus platycarpus</i> Thuret, pl. entière	»	3,0	10,4
<i>Fucus serratus</i> L., pl. entière	4,5	18,0	108,0
<i>Cystosira fibrosa</i> Huds., pl. entière	»	3,9	9,2
Réglisse des bois (<i>Polyp. vulg. L.</i>), frondes	3,0	18,0	145,0

En résumé, on peut dire que le titane se rencontre ordinairement dans les plantes cryptogames comme dans les plantes phanérogames, avec cette réserve que, si la proportion du métal contenue dans la matière fraîche oscille autour du millionième, il y a des espèces de champignons chez lesquels le titane, au cas où l'on arriverait à en établir la présence d'une manière définitive, serait en proportion beaucoup plus petite, dix fois moindre et au-dessous, que dans le cas général.

Cette réserve n'exclut pas la possibilité du rôle physiologique du titane chez les plantes, car elle vise des espèces dont les besoins à l'égard d'autres éléments, en particulier du manganèse (1), ont été démontrés extraordinairement réduits.

(1) Gabriel BERTRAND. *C. R. Ac. Sc.*, 154, 1912, p. 616 ; avec plus de détails : *Bull. Soc.*, 4^e série, 2, 1912, p. 400 et ces *Annales*, 26, 1912, p. 767.

ÉTUDE SUR L'IMMUNITÉ NATURELLE ET ACQUISE DES *PYRAUSTA NUBILALIS*

par S. MÉTALNIKOV et V. CHORINE.

Nous avons signalé maintes fois que les insectes présentent une immunité extraordinaire envers les microbes les plus dangereux. Il est très difficile de contaminer un insecte, de lui inoculer par voie naturelle quelque virus. Même une injection de microbes dans la cavité du corps ne provoque souvent aucune contamination [45].

Toutes ces constatations témoignent en faveur de ce fait que les insectes possèdent des moyens de défense tout à fait exceptionnels.

Les nombreuses recherches faites sur divers insectes démontrent que ceux-ci s'immunisent aussi très facilement. Il suffit souvent d'injecter une petite dose d'une culture chauffée pour obtenir en quinze-vingt-quatre heures une immunité solide envers le microbe donné.

La question se pose donc naturellement de savoir si cette facilité avec laquelle se produit l'immunité acquise pourrait présenter des obstacles insurmontables pour l'emploi de méthodes bactériologiques dans la lutte contre les insectes nuisibles.

Pour résoudre cette question, nous avons entrepris toute une série de recherches sur l'immunité des chenilles de *Pyrausta*.

Pour bien étudier l'immunité naturelle et acquise d'un insecte, il faut d'abord établir la méthode précise permettant de titrer la virulence de chaque microbe en particulier. Pour cela nous opérons comme il suit : nous prenons une culture sur gélose de vingt-quatre heures et nous l'émulsionnons dans 1 cent. cube d'eau physiologique. Ensuite nous préparons plusieurs titres-spécimens dans des tubes à essai en ajoutant 1, 3, 5, 10 anses de cette émulsion mère à 1 cent. cube

de solution physiologique. Pour inoculer la chenille, nous nous servons toujours d'une pipette de Pasteur effilée (fig. 1) qui permet d'introduire une dose bien déterminée (1).

Si la culture n'est pas très virulente, la dilution ne se fait pas à l'aide d'une anse, mais à l'aide d'une pipette. En ajoutant à 1 cent. cube d'eau physiologique I, III, V, X gouttes de l'émulsion-mère, nous pouvons préparer des dilutions plus

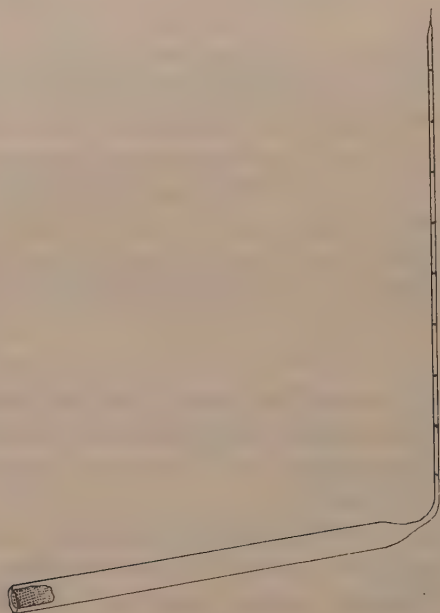


FIG. 1.

fortes. Cette méthode permet de déterminer avec une assez grande précision la dose minima mortelle pour chaque microbe. Encore plus exacte est la méthode de numération des bactéries, mais elle est beaucoup plus compliquée.

En inoculant les chenilles, il faut prendre garde de ne pas endommager les organes internes.

Les chenilles inoculées sont placées dans des bocaux. Pour retirer de petites quantités de sang, on se sert de tubes capillaires effilés qu'on introduit dans le corps de la chenille infectée. Pour prendre le sang en grande quantité, il faut préalablement

(1) Chaque centimètre de cette pipette correspond à 1/100 de cent. cube.

désinfecter la chenille en la lavant pendant quelques minutes dans un liquide antiseptique (éther ou solution phéniquée à 2 p. 100). En coupant une patte et en pressant légèrement, on peut retirer quelques gouttes de sang que l'on recueille dans un tube stérilisé.

A des intervalles de temps précis, on prélève du sang chez la chenille infectée et on l'étudie sur des frottis colorés. Cela permet de suivre pas à pas le sort des microbes dans le sang de la chenille. Pour étudier les changements qui s'opèrent à l'intérieur de l'organisme, il est indispensable de préparer des coupes. Les chenilles sont fixées dans une solution de Bouin et Duboscq ou dans une solution bouillante de sublimé corrosif avec acide acétique (5 p. 100) et elles sont incluses dans la paraffine d'après les méthodes ordinaires.

IMMUNITÉ NATURELLE.

En premier lieu nous nous sommes posé la question de savoir comment se comportent les chenilles de *Pyrausta* envers les microbes les plus variés qui provoquent différentes maladies chez les insectes et autres animaux.

Dans ce but, nous avons fait un grand nombre d'expériences avec les microbes que nous avons isolés dernièrement des *Pyrausta* malades, et avec d'autres microbes.

Les résultats des expériences sont exposés dans le tableau I.

Chaque microbe était expérimenté soit par injection d'une émulsion bien titrée dans la cavité du corps, soit *per os*. Nous avons utilisé des tiges d'armoise (*Artemisia vulgaris*) ou du maïs pour nourrir les chenilles. Avant de donner ces tiges aux insectes nous les avons trempées dans une émulsion de microbes développés sur milieu solide.

D'après ce tableau, on voit que tous les microbes sur lesquels nous avons expérimenté peuvent être répartis en deux groupes :

Le premier groupe comprend les microbes les plus virulents qui provoquent une maladie mortelle même par ingestion. Ils sont encore plus virulents par injection. Il suffit d'injecter une dose minima (1 anse d'émulsion mère dans 1-50 cent. cube d'eau physiologique) pour tuer à coup sûr l'animal.

Les 6 premiers microbes que nous avons isolés des *Pyrausta*

malades, de *Galleria mellonella* et des chenilles d'*Ephestia* sont particulièrement dangereux.

La grande bactérie du Canada, *Bacterium galleriæ* n° 2, et

	VIRULENTS per os	VIRULENTS par injection
I. — Microbes très virulents pour les chenilles de <i>Pyrusta</i> .		
1. <i>Cocobacillus Ellingeri</i>	++++	++++
2. <i>Vibrio Leonardi</i>	+++	+++
3. Grande bactérie du Canada	++++	++++
4. <i>Bacterium galleriæ</i> n° 2	++++	++++
5. <i>Bacterium Thuringiensis</i> n° 1	++++	++++
6. <i>Bacterium Thuringiensis</i> n° 2	++++	++++
7. <i>Bacterium Gibsoni</i> n° 1	+++	+++
8. <i>Bacterium Ontarioni</i> n° 2	+	++++
9. <i>Bacterium Christici</i> n° 3	++ (+)	+++
10. Bactérie de Cazadon n° 1	++	+++
11. Bactérie de Cazadon n° 2	+	+++
12. Bactérie de Candon	++	+++
13. <i>Bacterium prodigiosus</i> de Tateiwa	++	+++
14. <i>Bacterium</i> de Zotto	+	+++
15. <i>Cocobacillus acridiorum</i> d'Hérelle	++	+++
II. — Microbes peu virulents ne donnant la maladie que par injection.		
16. <i>Bacterium pyraustæ</i> n° 3		+++
17. <i>Bacterium pyraustæ</i> n° 4		+++
18. <i>Bacterium pyraustæ</i> n° 5		+++
19. <i>Bacterium pyraustæ</i> n° 6		+++
20. <i>Bacterium pyraustæ</i> n° 7		+
21. <i>Micrococcus pyraustæ</i>		+
22. <i>Mycoderma clayi</i>		+
23. <i>Bacterium galleriæ</i> n° 3		+++
24. <i>Proteus</i> X-19		++++
25. <i>Bacterium thiotrix</i>		++
26. Bacille paratyphique		++
27. Staphylocoque blanc		++
28. Streptocoque <i>Ephestiae</i>		++
29. Bactérie Danysz		+
30. Bacille tuberculeux hum.		0
31. Bacille tuberculeux pisc.		0
++++, mortalité très forte (jusqu'à 100 p. 100); +++, mortalité moins forte (jusqu'à 75 p. 100); ++, mortalité moyenne (jusqu'à 50 p. 100); +, mortalité faible (jusqu'à 10-20 p. 100).		

Bacterium Thuringiensis, sont sporulés et conservent leur virulence pendant très longtemps.

Les bactéries de Cazadon et de Candon (n°s 10, 11, 12) ont été isolées de chenilles malades et mortes que nous avons reçues grâce à l'obligeance de M. Parker; nous nous faisons un plaisir de le remercier pour son aimable concours. Toutes les chenilles

que nous avons reçues de Cazadon et de Candon étaient infectées et moururent bientôt. Pour la première fois, nous avons eu l'occasion d'observer ici une véritable épizootie des chenilles de *Pyrausta*. Cependant les microbes que nous avons isolés de ces chenilles n'étaient pas aussi virulents que les microbes précédents.

Le second groupe contient les microbes moins virulents ou complètement avirulents; ils ne donnent la maladie que par inoculation.

Les chenilles résistent très bien aux faibles doses de ces microbes et meurent seulement si on en injecte des doses assez fortes (1, V gouttes d'émulsion mère dans 1 cent. cube d'eau physiologique).

Notons encore un fait intéressant : parmi tous les microbes avec lesquels nous avons expérimenté (plus de 30 espèces), c'est le bacille tuberculeux qui est le moins virulent pour les chenilles de *Pyrausta*; on peut leur en injecter des quantités formidables sans produire aucun trouble. Ce qui est surtout important, c'est que tous ces bacilles tuberculeux sont complètement digérés et détruits dans l'organisme des chenilles. Tous les autres microbes que nous avons étudiés sont plus ou moins virulents pour les chenilles de *Pyrausta*.

En comparant l'immunité naturelle de *Pyrausta* avec celle de *Galleria mellonella*, que nous avons beaucoup étudiée, nous voyons que les *Pyrausta* sont beaucoup plus sensibles au virus microbien que les *Galleria mellonella*. Nous n'avons jamais pu donner une maladie mortelle aux chenilles de *Galleria mellonella* par ingestion (sauf dans quelques cas où nous avons utilisé des microbes fraîchement isolés). Chez les chenilles de *Pyrausta*, au contraire, l'infection par ingestion réussit très bien avec plusieurs microbes, mais elles sont surtout sensibles aux inoculations.

Presque tous les microbes que nous avons expérimentés donnent une maladie mortelle.

IMMUNITÉ ACQUISE.

Il est à présent bien établi que les insectes s'immunisent très facilement. Les travaux de Glaser, Hollande, Paillot,

Métalnikov, Toumanoff, Chorine, Zernoff ont démontré qu'on peut immuniser par des méthodes variées, par l'injection 1° d'une vieille culture atténuée; 2° d'une culture virulente chauffée à 60°; 3° de doses très minimes de cultures virulentes. Une nouvelle inoculation, faite vingt-quatre heures ou plusieurs jours après la première avec une dose mortelle de microbes virulents, ne détermine pas de maladie mortelle.

Comme nous l'avons vu, l'immunité acquise des insectes n'est pas très forte. L'insecte immunisé peut supporter plusieurs doses mortelles, mais il ne supporte pas des doses massives. Au contraire, l'insecte immunisé est souvent plus sensible envers les doses massives et meurt plus vite que l'insecte normal non immunisé [29]. Voilà pourquoi, avant de commencer des expériences sur l'immunisation, il est nécessaire de bien connaître la virulence du microbe donné, c'est-à-dire qu'il faut bien déterminer la dose minima mortelle, d'après les méthodes que nous avons indiquées plus haut.

Nos premières expériences sur les chenilles de *Pyrausta* ont été très décourageantes. Toutes nos tentatives d'immunisation des chenilles contre les microbes les plus dangereux (*Coccobacillus Ellingeri*, *Vibrio Leonardi*, *Bact. de Galleria*, *B. Thurin-giensis* et bactérie du Canada) n'ont pas donné de résultats positifs. Les chenilles prétendues immunisées mouraient souvent plus vite que les chenilles non immunisées. Nous avons essayé toutes les méthodes usuelles : immunisation par les vaccins chauffés, tués, atténués, par des cultures très vieilles, par ingestion, etc.; les résultats furent toujours négatifs.

L'étude du sang sur les frottis nous a démontré que tous ces microbes ne sont pas phagocytés (pl. I, fig. 11). Ne trouvant pas de résistance dans l'organisme, ils se multiplient avec une grande rapidité et l'animal meurt de septicémie en quelques heures. Cette chimiotaxie négative des phagocytes envers les microbes virulents est peut être la raison principale pour laquelle l'immunisation ne réussit pas.

Toutes nos tentatives pour changer la chimiotaxie négative des phagocytes en chimiotaxie positive n'ont pas donné de résultats jusqu'à présent.

Nous nous sommes alors adressés aux microbes peu virulents (*Bac. de Danysz*, *Bact. galleriæ* n° 1, etc.).

EXPÉRIENCE N° 1. — Nous avons d'abord préparé un vaccin du Bacille Danysz chauffé une heure à 58-60° en partant d'une jeune culture sur gélose (vingt-quatre-quarante-huit heures).

10 chenilles de *Pyrausta* sont vaccinées par injection d'une goutte (1/100 de cent. cube) de vaccin chauffé.

Le lendemain elles reçoivent une ou deux doses mortelles de *B. Danysz* vivant.

Vingt-quatre-quarante-huit heures après cette injection, 8 chenilles restent vivantes, 2 sont mortes.

Contrôle : 10 chenilles reçoivent une ou deux doses mortelles de *B. Danysz* vivant.

Vingt-quatre-quarante-huit heures après toutes les chenilles sont mortes.

EXPÉRIENCE N° 2. — 10 chenilles de *Pyrausta* sont vaccinées par injection d'une goutte (1/80, 1/100 de cent. cube) de *Bac. galleriæ* n° 1 chauffé à 60°.

Le lendemain elles reçoivent une dose mortelle de *B. galleriæ* n° 1 vivants.

Vingt-quatre-quarante-huit heures après toutes les chenilles sont vivantes.

Contrôle : 10 chenilles de *Pyrausta* reçoivent une dose mortelle de *Bact. galleriæ* n° 1 vivants.

Vingt-quatre-quarante-huit heures après toutes les chenilles sont mortes de septicémie.

D'après ces expériences nous pouvons dire que les chenilles de *Pyrausta* peuvent facilement s'immuniser contre des microbes peu virulents, mais elles ne peuvent pas établir une immunité acquise par les méthodes usuelles, contre les microbes les plus dangereux.

Quelles sont les causes de l'immunité naturelle et acquise? Quelles sont les forces qui luttent contre les microbes et les exterminent dans l'organisme infecté?

Pour résoudre ces questions nous avons fait toute une série de recherches. Nous avons étudié les phénomènes de l'immunité sur les frottis de sang et sur les coupes des animaux immunisés par différents microbes.

PHAGOCYTOSE.

Le sang des chenilles de *Pyrausta* présente un liquide transparent jaunâtre qui noircit assez vite à l'air, grâce à un ferment oxydant spécial qui agit sur le chromogène du sang.

On trouve habituellement dans le sang des insectes plusieurs types de globules sanguins, qui ont été décrits par Cuenot, Hollande [48], Métalnikov [45], Paillot [57], Zotta [5], Aghar [7] et autres : 1° les lymphocytes, 2° les proleuco-

cytes; 3° les leucocytes; 4° les cellules sphérulées; 5° les œnocytes;

Vu le rôle important joué par ces cellules dans l'immunité, nous avons repris l'étude du sang et de ses éléments chez les *Pyrausta*.

L'étude cytologique a été faite d'après la méthode suivante; les frottis de sang (bien étalé) sont fixés cinq à huit minutes par le colorant May-Grunwald, et colorés dix-vingt minutes par la solution d'Unna (III-IV gouttes pour 1 cent. cube d'eau). Tous les éléments apparaissent ainsi très nettement différenciés: le noyau est coloré en rouge, le protoplasma en bleu-violet.

Nous distinguons chez les *Pyrausta* 4 types de cellules différentes.

Premier type. — Élément rond à gros noyau entouré d'un protoplasma homogène fortement colorable (pl. I, fig. 1). Ce sont les proleucocytes et lymphocytes de Hollande.

Deuxième type. — Éléments à noyau plus petit et à couche protoplasmique granuleuse et colorée en bleu pâle. Ce sont de vrais leucocytes ou phagocytes (pl. I, fig. 2).

Troisième type. — Œnocytes. Grandes cellules à protoplasme très homogène. Très rares chez les *Pyrausta*.

Quatrième type. — Cellules sphérulées. Ce sont des éléments très originaux, spécifiques pour les insectes (pl. I, fig. 3). Dans le sang normal on en trouve de 2 à 7 p. 100 et c'est seulement après l'injection de certains microbes qu'elles apparaissent en grande quantité. Elles semblent jouer un rôle assez important dans le mécanisme de l'immunité.

Nous distinguons ordinairement deux espèces de cellules sphérulées: cellules à sphérules incolores (pl. I, fig. 4 et 6) et cellules à sphérules colorées en bleu foncé par le panchrome d'Unna et Pappenheim.

La cellule à sphérules incolores représente une cellule volumineuse avec un noyau coloré en rouge et entouré de sphérules incolores. A côté d'une ou deux grandes sphérules on en trouve une quantité de petites et moyennes qui entourent le noyau de tous côtés.

Les cellules à sphérules colorées apparaissent souvent en très grandes quantités dans le sang des chenilles contaminées ou immunisées par un vaccin (pl. I, fig. 5).

La quantité de ces cellules augmente considérablement : de 5 et 7 p. 100 elle atteint 50 et 60 p. 100.

Nous avons pu souvent observer la lyse ou la désagrégation de ces curieuses cellules (pl. I, fig. 6 et 7). Toutes les sphérules se séparent du noyau et se dispersent dans le sang. C'est certainement une sorte de sécrétion interne de quelque substance préparée par les cellules sphérulées. C'est pourquoi on pourrait croire que ce sont de vraies glandes unicellulaires, mobiles.

D'où proviennent ces cellules sphérulées?

Puisque les chenilles n'ont pas d'organes spéciaux hématopoïétiques, nous devons admettre que ces cellules dérivent de proleucocytes ou de leucocytes. En réalité nous avons vu quelquefois des formes intermédiaires entre ceux-ci.

Quels sont parmi ces éléments sanguins ceux qui prennent part à la phagocytose?

En premier lieu, ce sont les leucocytes qui englobent les microbes et toutes les substances étrangères (carmin, encre de Chine, etc.) introduits dans le sang des chenilles.

Après vingt-cinquante minutes on trouve déjà nombre de phagocytes ayant absorbé les microbes ou les couleurs.

Les proleucocytes peuvent aussi phagocyter, mais ils le font plus tard, et pas toujours.

Les autres éléments ne prennent aucune part à la phagocytose.

A une température plus basse (15-20°) la réaction phagocytaire ne se déclare qu'une ou deux heures après. Au-dessous de 10° il n'y a plus de phagocytose.

Le maximum de l'activité phagocytaire se manifeste quatre-six heures après l'injection.

La nature et la quantité de la substance injectée jouent aussi leur rôle.

Il y a des bactéries que les phagocytes englobent très vite. Tels sont les bacilles tuberculeux, les staphylocoques, les microcoques, etc.

Parmi les microbes qui ne provoquent point de réaction phagocytaire se trouvent les plus virulents et les plus dangereux pour les chenilles (*Coccobac. Ellingeri*, *Vibrio Leonardi*, *Bact. du Canada*, *Bact. galleriæ* n° 2, *Bact. B. Thuringiensis*, etc.).

Ainsi, ayant injecté aux chenilles une émulsion de *Bact.*

ephestiæ ou de *Coccob. Ellingeri*, la phagocytose n'eut pas lieu.

EXPÉRIENCE 25. — 5 chenilles ont reçu une injection de 1/10 de cent. cube d'émulsion de culture (*Bact. Thuringiensis*). L'examen du sang, une, trois, dix heures après l'injection démontre l'absence complète de phagocytose.

EXPÉRIENCE n° 26. — 5 chenilles ont reçu une injection de 1/100 de cent. cube d'émulsion de *Coccobac. Ellingeri*. Toutes les chenilles sont mortes vingt-vingt-quatre heures après. Pas de phagocytose. Destruction de tous les éléments sanguins et septicémie.

En étudiant la phagocytose dans les cas d'infection les plus variés, nous avons souvent vu une réaction phagocytaire très intense se produire, même dans le cas d'infection mortelle.

Nous avons observé ce phénomène après l'ingestion d'une forte dose de bactéries peu virulentes (staphylocoques ou microcoques). Si peu virulent que soit le microbe pour la chenille, on peut toujours trouver la dose maxima qui la tuera. La phagocytose atteint, chez les chenilles injectées, le maximum d'intensité après trois-cinq heures. Puis la réaction phagocytaire commence à baisser, mais néanmoins elle dure souvent jusqu'à la mort de l'insecte.

Nous avons souvent observé une phagocytose très intense chez les chenilles de différents insectes envers les microbes les plus virulents (charbon, certains microcoques, etc.). En injectant, par exemple, dans la cavité générale de la chenille, le charbon ou un microcoque (isolé de *Galleriæ*) on provoque une phagocytose très forte qui continue sans relâche jusqu'à la mort.

Dans d'autres cas, nous ne trouvons la phagocytose que dans les stades primaires de l'infection mortelle; puis, au fur et à mesure que la maladie se développe, la phagocytose diminue peu à peu et les microbes, ne trouvant plus d'obstacles, se multiplient et provoquent la septicémie.

Tel est le cas dans l'infection des chenilles par *Thirotrix*, *B. subtilis*.

Enfin la phagocytose fait complètement défaut au commencement de l'infection et se développe dans la suite. Nous avons pu observer ce phénomène en infectant les chenilles de *Pyrausta* avec le *Proteus*. Au début on ne trouve pas de phagocytose. Ni les proleucocytes ni les leucocytes n'englobent les

microbes qui se multiplient sans obstacles. Ce n'est qu'après quinze-vingt heures que nous avons pu trouver dans le sang des *proleucocytes* qui commençaient à englober les microbes. Mais cette intervention des *proleucocytes* est trop tardive et ne sauve pas l'animal qui meurt en quelques heures (pl. I, fig. 10).

C'est donc toute une gamme de phagocytose à divers degrés que nous trouvons dans les différentes infections des chenilles :

I. Absence de phagocytose du commencement jusqu'à la fin : cas les plus dangereux ;

II. Phagocytose au début de l'infection et qui cesse peu à peu dans la suite ;

III. Phagocytose absente ou très faible au début, se développant dans la suite ;

IV. Phagocytose du commencement jusqu'à la fin.

Comme nous l'avons vu plus haut, les infections les plus graves et les plus rapides, les infections contre lesquelles il est impossible d'immuniser l'animal, s'observent ordinairement dans le premier cas, c'est-à-dire quand il y a absence totale de phagocytose.

Le quatrième cas est le plus favorable, quand la phagocytose dure tout le temps de l'infection. Mais la phagocytose la plus intense n'est souvent pas capable de surmonter l'invasion des microbes, si les germes phagocytés ne sont pas digérés.

DIGESTION INTRACELLULAIRE.

Le dernier acte par lequel s'achève la réaction phagocytaire est la digestion intracellulaire. Absorbés par les phagocytes les microbes se dissolvent peu à peu dans le protoplasma du phagocyte.

L'examen microscopique montre que lors de l'absorption, par exemple des bacilles tuberculeux ou des staphylocoques peu virulents, une dissolution progressive a lieu dans le protoplasme des phagocytes. Les bacilles tuberculeux qui se coloraient bien par la fuchsine de Ziehl perdent peu à peu cette aptitude et disparaissent.

Si la dose injectée est très forte, il se forme des agglomérations de phagocytes où s'achève la digestion. Il n'est pas rare alors d'observer la pigmentation des microbes en voie de diges-

tion (pl. I, fig. 12, 13 et leur transformation en un pigment brun-noir.

Cette pigmentation des microbes a été bien vue dernièrement par Hollande 18. L'examen microscopique montre que certaines bactéries subissent toute une série d'altérations : souvent leur protoplasme se gonfle et elles sont résorbées peu à peu. Les bacilles Danysz injectés dans la cavité générale des chenilles se transforment en granulations rondes à l'extérieur et à l'intérieur des phagocytes et sont digérés très vite dans le protoplasme des phagocytes.

La rapidité de la digestion dépend, comme nous l'avons démontré, non seulement de la température, mais aussi de la quantité de microbes injectés. Si l'on injecte à la chenille une très grande quantité de microbes peu virulents, les phagocytes s'en bourrent à tel point qu'ils ne sont pas en état de les digérer et qu'ils se détruisent eux-mêmes.

Dans d'autres cas, les phagocytes ne sont pas capables de digérer les microbes englobés parce que ces derniers dégagent certaines substances toxiques qui tuent les phagocytes et les détruisent. Dans certains cas de très grandes vacuoles se forment et les phagocytes se gonflent outre mesure (pl. I, fig. 9); il en résulte la prompte destruction des phagocytes et la mort des chenilles.

FORMATION DES CELLULES GÉANTES ET DES CAPSULES.

Quand les phagocytes ne peuvent pas détruire les microbes dans un court délai, on observe alors leur tendance à s'agglomérer et à former des cellules géantes ou des plasmodes. C'est une sorte de coopération des cellules grâce à laquelle un double but se trouve atteint : d'abord la fixation de grandes masses de microbes dans un lieu déterminé, puis l'intensification de la digestion intracellulaire grâce à la fusion des cellules. C'est surtout après l'injection de bacilles tuberculeux peu virulents et en même temps très résistants qu'on trouve une grande quantité de ces plasmodes. La fusion des cellules commence aussitôt après l'injection des microbes. Trois-quatre heures après l'injection de fortes doses de microbes on trouve déjà dans le sang (sur les frottis et surtout sur les coupes) beaucoup

de cellules agglomérées, à l'intérieur desquelles se voient des masses de microbes. Avec le temps, ces agglomérations deviennent plus compactes, car toutes les cellules se fusionnent, digèrent les bacilles et les transforment en un pigment brun (pl. I, fig. 12). Vingt-quatre, quarante-huit heures après l'injection on trouve une quantité de leucocytes et de proleucocytes qui affluent vers la périphérie de ces cellules géantes. Ils se disposent concentriquement et s'étendent souvent en longs filaments. C'est ainsi que se forment tout autour des capsules compactes, à l'intérieur desquelles les microbes sont complètement emprisonnés et rendus inoffensifs (pl. I, fig. 13).

Nous avons observé quelquefois, chez les chenilles injectées avec des doses massives de cultures virulentes, des formations qui rappellent beaucoup les abcès des animaux supérieurs.

Trois-quatre jours après l'injection de ces microbes on trouve souvent sur la peau des taches noires disposées en différentes parties du corps. C'est surtout chez les chenilles de *Galleria mellonella* que nous avons souvent trouvé ces formations intéressantes.

L'étude de ces taches sur les coupes a montré que nous avons là de grandes agglomérations de leucocytes et de proleucocytes qui entourent des masses de microbes déjà à moitié digérés et transformés en un pigment brun foncé. Ces agglomérations se trouvent immédiatement sous la peau. Peu à peu, à cette même place, l'épiderme et la cuticule commencent à se pigmenter. Finalement la cuticule crève et son contenu se trouve à nu. Mais un nouvel épiderme se forme au-dessous. L'analogie avec l'abcès est frappante (fig. 15).

RÉACTIONS DES CELLULES.

Tout organisme représente un système harmonieux. La moindre infraction à cette harmonie par l'introduction dans l'organisme de doses minimales de substances quelconques étrangères y provoque une brusque réaction de toutes les cellules qui tendent à rétablir l'équilibre interrompu.

Ces réactions des cellules constituent la base de la défense et de l'immunité.

Tout d'abord nous voyons réagir les cellules mobiles, c'est-à-

dire les leucocytes, les proleucocytes, les cellules sphéruleuses, etc. Ce n'est pas seulement la quantité de telles ou telles cellules qui varie beaucoup, mais aussi leur aspect extérieur. En d'autres termes, la réaction se fait, non seulement par la cellule dans son entier, mais aussi par ses parties isolées et surtout par le protoplasma.

Le protoplasme, dans certains cas, devient plus clair; dans d'autres cas il devient plus compact et granuleux. Il laisse souvent voir des granulations et des sphérules variées se colorant différemment. Quelquefois, sous l'influence de tel ou tel autre excitant, des vacuoles apparaissent. Ces vacuoles peuvent atteindre de grandes dimensions et la cellule s'abîme peu à peu. L'agglutination des leucocytes et la formation des agglomérations sont aussi l'une des formes de réaction typique qu'on trouve ordinairement après l'ingestion de différents microbes.

Chaque substance, chaque microbe introduits dans le corps provoque une réaction spécifique. La quantité des cellules différentes qui participent à cette réaction, leurs rapports mutuels, la durée de la réaction, la phagocytose, la digestion des microbes, la formation des cellules géantes, etc., tout est typique pour chaque excitant, pour chaque réaction.

Nous donnons ci-dessous la description de quelques expériences.

Formule leucocytaire du sang normal de la chenille de *Pyrausta*.

Leucocytes	30 à 69 p. 100
Proleucocytes	27 à 45 p. 100
Cellules sphéruleuses	2 à 8 p. 100

EXPÉRIENCE 25. — 10 chenilles de *Pyrausta* ont reçu une dose mortelle de *Coccobacillus Ellingeri*. Vingt-vingt-quatre heures après l'injection, toutes les chenilles sont mortes. L'examen du sang démontre l'absence complète de phagocytose et les variations typiques de la formule leucocytaire.

**Variations des éléments sanguins
après l'injection de *Coccobacillus Ellingeri*.**

	AVANT l'expérience	1 h.	2 h. 1/2	6 h., 9 h. 1/2. 24 h.
	p. 100	p. 100	p. 100	—
Leucocytes	58	42	31	Destruction des éléments sanguins et septicémie.
Proleucocytes	34	31	48	
Cellules sphéruleuses	8	27	21	

Après six heures la quantité des éléments sanguins est si faible qu'il est difficile de les compter.

EXPÉRIENCE 26. — 10 chenilles ont reçu une dose non mortelle de *B. subtilis galleriæ* peu virulents pour les *Pyrausta*. L'examen du sang démontre la phagocytose et la destruction des microbes. Deux heures et demie après l'injection on ne trouve plus de bacilles libres.

**Variations des éléments sanguins
après l'injection de *B. subtilis galleriæ*.**

	AVANT l'expérience	1 h.	2 h.	1/2	6 h.	9 h.	12	21 h.
	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100
Leucocytes	60	54	26	36	43	36		
Proleucocytes	36	36	60	47	49	26		
Cellules sphéruleuses	4	40	14	17	36	18		

EXPÉRIENCE 28. — 10 chenilles ont reçu une dose mortelle de *Bacterium galleriæ* n° 2. Dix, quinze heures après l'injection, toutes les chenilles sont mortes. L'examen du sang démontre l'absence complète de phagocytose. Après six heures presque tous les éléments du sang disparaissent. Les bactéries pullulent sans obstacles.

**Variations des éléments sanguins
après l'injection de *Bacterium galleriæ* n° 2.**

	AVANT l'expérience	1 h.	2 h.	1/2	6 h.	15 h.
	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100		
Leucocytes	55	51	34	48	} Toutes les chenilles sont mortes.	
Proleucocytes	40	37	38	36		
Cellules sphéruleuses	5	42	28	16		

EXPÉRIENCE 29. — 10 chenilles ont reçu une dose mortelle de *B. proteus*. Toutes les chenilles sont mortes vingt-quatre heures après l'injection de ces microbes. L'examen microscopique du sang démontre la dégénération progressive des éléments du sang. Absence de phagocytose. Nous avons vu dix-quinze heures après l'injection les bacilles absorbés par quelques proleucocytes (fig. 10).

Variation des éléments sanguins après l'injection de *B. proteus*.

	AVANT l'expérience	1 h.	6 h.	9 h.	1/2	24 h.
	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100		
Leucocytes	44	50	32	36	} Toutes les chenilles sont mortes.	
Proleucocytes	53	43	40	41		
Cellules sphéruleuses	3	47	28	23		

EXPÉRIENCE 30. — 10 chenilles ont reçu une dose mortelle de bactéries *Thuringiensis*, très virulentes pour les chenilles de *Pyrausta*. Les chenilles tombent malades et meurent après quinze-vingt heures. Absence complète de phagocytose. Destruction progressive de tous les éléments du sang. Augmentation énorme des cellules sphéruleuses (jusqu'à 58 p. 100 après neuf heures). Septicémie.

**Variations des éléments sanguins
après l'injection d'une dose mortelle de *B. ephestiæ*.**

	AVANT l'expérience	1 h.	2 h. 1/2	6 h.	9 h. 1/2
	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100	p. 100
Leucocytes	52	54	48	37	29
Proleucocytes	43	32	56	53	42
Cellules sphéruleuses	5	44	46	40	58

L'étude de tous ces changements sur les frottis du sang ainsi que sur les coupes nous montre que chaque microbe, chaque substance introduite dans l'organisme de l'animal provoque une série de réactions de défense spécifiques.

Mais cette spécificité ne s'exprime pas seulement par les changements d'aspect de la cellule même, par les modes d'engloutissement, de digestion et de destruction des microbes, mais aussi par les variations de la formule leucocytaire.

Nous avons fait de nombreuses expériences sur différentes chenilles et nous avons toujours vu des variations très typiques pour chaque espèce de microbes ou d'excitants internes.

Il ne faut pas oublier toutefois que ces variations leucocytaires dépendent, non seulement de tel ou tel microbe, de tel ou tel excitant, mais aussi de toute une série d'autres causes : température, âge de l'animal, son état physiologique, qualité et quantité des substances injectées, etc.

On peut dire que chaque réaction de l'organisme est au fond originale, individuelle, et ne se répète pas. Chaque réaction représente un acte non réitérable de la nature et si, néanmoins, nous parlons de spécificité de la réaction, nous entendons par là les traits typiques communs que nous pouvons trouver dans les phénomènes infiniment divers que présentent les réactions des cellules. Ces traits typiques existent aussi dans les formules leucocytaires chez les chenilles infectées par différents microbes. Nous avons toujours pu constater, dans nos expériences, la diminution rapide du nombre des leucocytes et l'augmentation parallèle du nombre des proleucocytes.

Nous avons toujours vu les réactions très typiques des cellules sphéruleuses, les réactions phagocytaires des leucocytes, etc. Ce qui frappe dans ces expériences, c'est la rapidité avec laquelle les éléments cellulaires réagissent contre l'intro-

duction de substances étrangères dans le corps. Déjà trente à soixante minutes après l'injection, la formule leucocytaire se modifie brusquement (voir les expériences 25, 29 et 30).

Il est difficile d'admettre la possibilité de la formation de nouvelles cellules dans un délai aussi bref; il est plus vraisemblable de supposer que les cellules se modifient elles-mêmes sous l'influence de quelque excitant.

Il est possible que cette modification de la formule leucocytaire, et surtout l'apparition de leucocytes granuleux ou sphéruleux, s'expliquent principalement par la réaction du protoplasme.

FACTEURS DE L'IMMUNITÉ.

Pour étudier les facteurs de l'immunité chez les insectes, et particulièrement chez les chenilles de *Pyrausta* et de *Galleria mellonella*, nous avons fait un très grand nombre d'expériences. Nous avons essayé les microbes très virulents, peu virulents et avirulents. Nous avons étudié les réactions de l'immunité autant sur des frottis que sur des coupes. Pour découvrir les anticorps, nous avons fait toutes les réactions nécessaires sur les agglutinines, précipitines, bactériolysines, opsonines, de même que les réactions de Bordet et Gengou.

Quels sont donc les forces et les moyens de défense contre les microbes et leurs toxines? Existe-t-il des facteurs spéciaux de l'immunité? Si ces facteurs existent, où siègent-ils? Dans les humeurs ou dans les cellules?

Il n'y a pas de doute que, dans tous les cas d'immunité naturelle et acquise chez les insectes, le rôle principal appartient aux réactions de défense des cellules mobiles, c'est-à-dire à la phagocytose.

Dans les cas où la phagocytose se produit et où la digestion des microbes se fait rapidement, l'animal surmonte avec succès l'infection et se rétablit.

Mais si la phagocytose ne se produit pas, ou si elle est très faible, si les phagocytes périssent sous l'action des toxines, l'infection se propage avec une grande vitesse et l'animal meurt.

Il ne nous est arrivé que rarement de ne pas constater la phagocytose après avoir injecté les microbes. Parmi ces der-

niers, ceux qui ne provoquaient pas de réaction phagocytaire étaient ceux qui sont le plus virulents pour *Pyrausta* : *Bacterium galleriæ* n° 2, *Coccobac. Ellingeri*, *Vibrio Leonardi*, *Bact. d'Ephestia* et du *Canada*.

Dans tous les autres cas, même lorsqu'on injectait des cultures assez virulentes, la phagocytose se produisait avec une intensité plus ou moins grande.

La présence de la phagocytose n'est donc pas encore une garantie de rétablissement.

Nous avons souvent constaté une phagocytose des plus intense dans les infections mortelles. La digestion des microbes se produit, mais finalement l'insecte meurt de septicémie, car les phagocytes n'ont pas été capables de surmonter et de vaincre les parasites. Lorsqu'on injecte des doses très faibles de ces mêmes microbes, les phagocytes en viennent facilement à bout et l'animal guérit.

La formation de plasmodies ou de cellules géantes est également une des réactions cellulaires de défense généralement observée après l'introduction dans l'organisme de microbes ou de substances étrangères.

Cette coopération des cellules intensifie la digestion de microbes et leur destruction.

Mais si elle ne parvient pas à détruire les microbes, il se forme autour des cellules géantes des capsules compactes, à l'intérieur desquelles tous les microbes sont digérés et transformés en un pigment brun-noir.

Enfin, nous avons vu chez les insectes se produire la formation sous la peau de véritables abcès par lesquels les microbes sont rejetés au dehors.

Nous pouvons donc dire que toutes les réactions de défense se réduisent à quatre méthodes principales :

- I. Destruction des microbes par digestion intracellulaire;
- II. Formation des plasmodies et cellules géantes;
- III. Formation des capsules;
- IV. Elimination des microbes par des formations d'abcès et de furoncles.

Mais existe-t-il chez les insectes de vrais anticorps qu'on trouve généralement chez les animaux supérieurs après l'immunisation?

Tous nos efforts pour trouver dans le sang des insectes les anticorps bien connus n'ont pas donné de résultats.

L'unique anticorps que nous ayons pu observer est la bactériolysine envers plusieurs microbes, comme, par exemple, les vibrions cholériques, le bacille Danysz, etc.

Des bactériolysines analogues furent décrites par Paillot [23], Hollande [15], Aghar [4], etc. Grâce à ces faits nous avons pensé que les anticorps jouent, chez les insectes, un rôle insignifiant. Cependant, tout récemment, grâce aux travaux très intéressants de Chorine et Zernoff, faits dans notre laboratoire, nous avons dû changer ce point de vue [69].

En étudiant l'immunité passive chez les insectes, Zernoff a démontré que les chenilles de *Galleria mellonella*, après avoir reçu du sang de chenilles immunisées avec la culture chauffée de *B. Danysz*, acquièrent l'immunité passive contre ce microbe. Mais dans les expériences suivantes il a constaté que les chenilles s'immunisaient passivement, non seulement contre les *B. Danysz*, mais aussi contre quelques autres microbes (*B. subtilis*, *Coccob. acridiorum*, etc.) [36]. Ainsi, nous pouvons admettre que dans le sang des chenilles immunisées existe un anticorps qui, cependant, n'est pas spécifique.

D'après Zernoff, cet anticorps ne se détruit pas à 60° ni à 70°. Le sang chauffé au-dessus de 70° diminue progressivement la propriété immunisante. L'existence de l'immunité passive chez les insectes fut démontrée dernièrement par les travaux de Hollande et Aghar [4].

Chorine a publié tout récemment un travail sur l'immunité antitoxique chez les insectes [7]. Il a démontré que les chenilles de *Galleria mellonella* s'immunisent contre la toxine diphtérique. Comme vaccin, il a employé l'anatoxine de Ramon. Dans une série d'autres expériences il a prouvé qu'il est possible de conférer l'immunité passive aux chenilles normales en utilisant le sang des chenilles immunisées préalablement vaccinées avec l'anatoxine diphtérique. De même, la toxine est neutralisée *in vitro* par le sang des chenilles immunisées. Il ressort de ces expériences que les chenilles sont capables d'élaborer une substance neutralisant la toxine, analogue à l'antitoxine des animaux supérieurs.

En comparant les insectes aux animaux supérieurs nous

pouvons constater qu'il n'y a pas, en principe, de différence de moyens, ni de méthodes particulières de défense contre les microbes.

La défense de l'organisme se réalise grâce à l'activité de différentes cellules qui englobent, digèrent les microbes et les rejettent au dehors s'il est possible. La production des anticorps est aussi une réaction de défense de cellules spéciales qui les préparent et les sécrètent.

Tout dépend donc de l'énergie et de la rapidité avec lesquelles les cellules agissent dans leur lutte avec les microbes.

Comme nous l'avons vu, les phagocytes apparaissent les premiers sur le champ de bataille, aussi bien chez les insectes que chez les animaux supérieurs (polynucléaires). C'est une véritable armée prête à tout moment à se précipiter sur l'ennemi. Malheureusement, ces cellules n'offrent pas à tout moment une grande résistance et se désagrègent facilement.

Ce sont les proleucocytes qui viennent à leur aide, soit par la phagocytose, soit par la production des cellules sphéruleuses qui, certainement, jouent un rôle très important dans l'immunité.

Pour comprendre et pour interpréter l'immunité il faut étudier en détail toutes les réactions de défense des différentes cellules de l'organisme ; il faut étudier les lois de leur activité, de même que l'influence des autres organes, des humeurs et surtout du système nerveux.

Pour démontrer le rôle du système nerveux dans l'immunité nous avons entrepris une série d'expériences sur les chenilles de *Galleria mellonella* [24].

Les centres nerveux des chenilles se trouvent, comme on le sait, au-dessous des téguments et sont très faciles à détruire par la brûlure. Les chenilles supportent bien cette opération et lui survivent deux ou trois semaines.

Les expériences ont démontré que la destruction des ganglions cérébraux, ventraux, et des deux premiers ganglions thoraciques n'agit pas sur l'immunité. Quant au troisième ganglion thoracique, sa destruction diminue rapidement l'immunité naturelle et acquise.

En nous basant sur un très grand nombre de travaux effec-

tués sur différents insectes, nous sommes en droit d'affirmer que toutes les réactions cellulaires deviennent, après l'immunisation, plus rapides, plus énergiques et plus efficaces. On peut dire que toutes les cellules d'un animal immunisé paraissent alors plus actives, c'est-à-dire plus sensibles envers le microbe donné (la sensibilité est donc la faculté que possède un être vivant de réagir à un excitant donné; plus cet être est sensible plus il réagit avec intensité).

M. Tateiwa [25], qui a travaillé dans notre laboratoire, a démontré par des courbes cette augmentation de l'activité et de la sensibilité des cellules chez un insecte immunisé.

C'est cette sensibilité renforcée des cellules qui semble être la cause principale de l'immunisation et de l'immunité acquise.

Quelle est la cause de cette augmentation de l'activité cellulaire chez les animaux immunisés?

Sont-ce les cellules qui modifient leur activité, ou sont-ce des causes extérieures, causes physico-chimiques, qui influencent les cellules? Autrement dit, les cellules sont-elles capables de s'immuniser?

Nous avons maintenant des preuves indiscutables que les cellules peuvent s'immuniser.

Nous devons citer premièrement les travaux de Petterson [62] et de Salimbeni [63] qui ont réussi à montrer que les phagocytes des animaux immunisés, injectés à un animal normal, lui donnent l'immunité. D'autre part, nous avons les travaux de Margineau, Mittermeyer et Carra qui ont démontré que les phagocytes des animaux immunisés possèdent un pouvoir phagocytaire plus grand et une résistance plus forte envers les toxines que ceux des animaux normaux.

Enfin, nous devons citer les travaux de Schultz, Friberger, Dale et autres sur les organes isolés. Ils ont démontré que les organes isolés des animaux immunisés sont très sensibles et réagissent violemment aux quantités minimales d'antigènes, tandis que les organes des animaux normaux non immunisés ne réagissent pas.

Tous ces faits nous montrent que les cellules de l'organisme immunisé avec un microbe ont été modifiées de telle sorte qu'elles vont réagir avec plus d'intensité à l'introduction de ce même microbe.

On peut dire que pendant l'immunisation toutes les cellules se mobilisent contre les microbes comme s'il s'agissait pour elles de combattre un véritable ennemi. Si cet ennemi réapparaît dans l'organisme, les phagocytes se précipitent avec une grande rapidité sur lui. Il se produit une réaction inflammatoire, une suppuration, une formation de cellules géantes, de capsules et d'abcès. Plus les cellules sont sensibles, plus elles réagissent activement pour défendre l'organisme.

L'activité cellulaire peut être renforcée par la stimulation, par l'exercice et par l'immunisation. La sécrétion par les cellules de substances défensives ou d'anticorps dans les humeurs est aussi une réaction de défense.

Cette combinaison de l'immunité cellulaire et humorale représente la forme parfaite de l'immunité, forme qui, malheureusement, ne se rencontre pas toujours dans les maladies infectieuses.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AGUAR (1928). — Contribution à l'étude de l'immunité chez l'insecte. *Thèse de Pharmacie à Montpellier.*
- [2] CANTACUZÈNE (1923). — Le problème de l'immunité chez les invertébrés. 75^e anniversaire de la Société de Biologie.
- [3] CHIGASAKI (1925). — Sur l'immunisation de *Galleria* aux différents stades de sa vie. *C. R. Soc. de Biol.*, **90**, p. 843.
- [4] CHORINE (1927). — Les microbes pathogènes de *Galleria mell.* *Ces Annales*, **41**, p. 1114.
- [5] CHORINE (1927). — Sur l'immunité des chenilles de la mite des abeilles. *C. R. Soc. de Biol.*, **96**, p. 1289.
- [6] CHORINE (1927). — Sur la spécificité de l'immunité chez les insectes. *C. R. Soc. de Biol.*, **97**, p. 1927.
- [7] CHORINE (1928). — Influence de la concentration en ions H du milieu de culture sur la virulence du *Coccobacille* de la Pyrale du Maïs. *C. R. Académie des Sciences*, **186**, p. 657.
- [8] CHORINE (1928). — Sur l'immunisation des chenilles de *Galleria mell.* contre le Bact. *Galleriæ* n° 2. *C. R. Académie des Sciences*, **186**, p. 1659.
- [9] CHORINE et KORVINE KROUKOVSKY (1929). — Sur l'immunisation des fragments isolés du corps des chenilles de *Galleria mell.* *C. R. Soc. de Biol.*, **100**, p. 15.
- [10] GLASER (1918). — Existence of immunity principles in insects. *Psycho l. of Entomology*, Boston, Mass., **10**, f. 25, p. 651.
- [11] GLASER (1924). — A bacterial disease of silkworms. *J. of Bact.*, **9**, p. 339.
- [12] GLASER (1925). — Acquired immunity in silkworms. *J. of Entom. Baltimore*, **10**, p. 651.

- [13] D'HÉRELLE (1914). — Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles. *C. R. Académie des Sciences*, **152**, p. 1443.
- [14] D'HÉRELLE (1914). — Les Coccobabilles des Sauterelles. *Ces Annales*, **28**, p. 280.
- [15] HOLLANDE (1919). — Absence d'alexine dans le sang des insectes. *C. R. Soc. de Biol.*, **82**.
- [16] HOLLANDE et VERNIER (1920). — *Coccobacillus insectorum*. *C. R. Académie des Sciences*, **171**, p. 206.
- [17] HOLLANDE (1921). — Culture pure mixte de levures et d'amibes cystiques. *Arch. de Zool. Exp.*, **60**, p. 33.
- [18] HOLLANDE (1928). — La phagocytose et la digestion du bactériophage tuberculeux par les leucocytes du sang des chenilles autres que *Galleria mell.* *C. R. Soc. de Biol.*, **99**.
- [19] HOLLANDE et VICHER (1928). — Vaccination de l'insecte par un virus vivant sensibilisé. *C. R. Soc. de Biol.*
- [20] ISHIMORI (1924). — Sur l'immunisation des chenilles. *C. R. Soc. de Biol.*, **90** p. 843.
- [21] E. I. VANOFF (1925). — Le sort des trypanosomes dans la cavité générale de *Galleria mell.* *C. R. Soc. de Biol.*, **93**, p. 571.
- [22] MÉTALNIKOV (1906). — Tuberkulose bei Bieninmotte. *Centr. f. Bakt.*, **40**.
- [23] MÉTALNIKOV (1907). — Contribution à l'immunité de la mite d'abeille vis-à-vis de l'infection tuberculeuse. *Arch. des Soc. de Biol.*, Petrograd, **12** et **13**.
- [24] MÉTALNIKOV (1908). — Recherches expérimentales sur les chenilles de *Galleria mell.* *Arch. Zool. Exp.*, **8**.
- [25] MÉTALNIKOV (1920). — Immunité naturelle et acquise chez les chenilles de *Galleria mell.* *Ces Annales*, **34**, 1^{er} Mémoire, p. 888.
- [26] MÉTALNIKOV (1920). — Bactérie dysentérique et bactériophage chez les chenilles de *Galleria mell.*, *C. R. Soc. de Biol.*, **83**.
- [27] MÉTALNIKOV (1921). — Immunité naturelle et acquise chez la chenille de *Galleria mell.*, 2^e Mémoire. *Ces Annales*, **35**, p. 363.
- [28] MÉTALNIKOV et GASCHEN (1921). — Sur la rapidité d'immunisation chez la chenille de *Galleria mell.*, *C. R. Soc. de Biol.*, **85**, p. 224.
- [29] MÉTALNIKOV et GASCHEN (1921). — Immunité et hypersensibilité chez la chenille. *C. R. Académie des Sciences*, **173**, p. 336.
- [30] MÉTALNIKOV (1922). — La mort stérile des chenilles infectées. *C. R. Soc. de Biol.*, **171**, p. 202.
- [31] MÉTALNIKOV et EPHRUSI (1922). — Phagocytose et virulence des microbes. *C. R. Soc. de Biol.*, **86**, p. 65.
- [32] MÉTALNIKOV (1922). — Une épizootie chez les chenilles. *C. R. Académie des Sciences*, **175**.
- [33] MÉTALNIKOV et KITAJIMA (1923). — Une maladie mortelle chez les chenilles de *Galleria mell.* *C. R. Soc. de Biol.*, **88**, p. 476.
- [34] MÉTALNIKOV et TOUMANOFF (1923). — La lèpre chez les insectes. *C. R. Soc. de Biol.*, **89**, p. 935.
- [35] MÉTALNIKOV (1923). — Rôle des anticorps dans l'immunité des chenilles. *Ces Annales*, **37**, p. 528.
- [36] MÉTALNIKOV et ISCHIMORI (1924). — Immunisation des chenilles par des substances non spécifiques. *C. R. Académie des Sciences*, **178**, p. 2136.
- [37] MÉTALNIKOV, M^{lle} KOSTRISKY et M^{me} TOUMANOFF (*Bacterium tumefaciens* chez les chenilles de *Galleria mell.*, *C. R. Académie des Sciences*, **179**, p. 225.

- 38] MÉTALNIKOV (1924). — Influence du système nerveux sur l'immunité des chenilles. *C. R. Académie des Sciences*, **177**, p. 671.
- 39] MÉTALNIKOV (1923). — Les 4 phagocytes d'*Ascaris megalocephala* et leur rôle dans l'immunité. *Ces Annales*, **37**, p. 680.
- 40] MÉTALNIKOV et TOUMANOFF (1925). — Réaction des cellules et phagocytose chez le cobaye normal et immunisé. *Ces Annales*, **39**, p. 909.
- 41] MÉTALNIKOV et TOUMANOFF (1925). — La tuberculose expérimentale chez le Phasme. *C. R. Soc. de Biol.*, **92**, p. 14.
- 42] MÉTALNIKOV et RAPKINE (1925). — La phagocytose et l'immunité chez les blastula et gastrula des oursins. *C. R. Académie des Sciences*, **181**, p. 437.
- 43] MÉTALNIKOV et CHORINE (1926). — Du rôle joué par les hyménoptères dans l'infection de *Galleria mell.* *C. R. Académie des Sciences*.
- 44] MÉTALNIKOV et CHORINE (1926). — Contribution à l'étude de l'immunité chez les invertébrés. *Ces Annales*, **40**.
- 45] MÉTALNIKOV (1927). — Infection microbienne et l'immunité chez les mites des abeilles. *Monographie de l'Institut Pasteur*. Edition Masson.
- 46] MÉTALNIKOV et CHORINE (1928). — Maladie microbienne chez les Pyrales du Maïs. *Ces Annales*, **42**.
- 47] MÉTALNIKOV et TOUMANOFF (1928). — Recherches expérimentales sur l'infection du *Pyrausta nub.* par des champignons entomophytes. *C. R. Soc. de Biol.*, **98**, p. 583.
- 48] MÉTALNIKOV et CHORINE (1928). — The Infectious Diseases of the Corn Borér. *Scientific Reports*. Edited by T. Ellinger.
- 49] MÉTALNIKOV, Tage ELLINGER et CHORINE (1928). — A new species isolated from diseased larvae of *Pyrausta nub.* *Hb. Scientific Reports*. Edited by T. Ellinger.
- 50] MÉTALNIKOV (1928). — Rôle des réactions de défense dans l'immunité. *Zeit. f. Immun.*, **61**, p. 27.
- 51] MÉTALNIKOV (1929). — Immunité d'adaptation et immunité de défense. *C. R. Soc. de Biol.*, **101**, p. 34.
- 52] METCHNIKOFF. — Immunité.
- 53] PAILLOT (1917). — Microbes nouveaux parasites des chenilles de *Lyma-dria dispar.* *C. R. Académie des Sciences*, **164**, p. 525.
- 54] PAILLOT (1929). — La Karyokynétose, nouvelle réaction d'immunité. *C. R. Académie des Sciences*, **169**, p. 396.
- 55] PAILLOT (1919). — Immunité naturelle chez les insectes. *Ibid.*, **169**.
- 56] PAILLOT (1921). — Immunité acquise chez les insectes. *C. R. Soc. de Biol.*, **83**, p. 278.
- 57] PAILLOT (1922). — Les microorganismes parasites des insectes; leur emploi en agriculture. *Ann. Epiph.*, **8**, p. 95.
- 58] PAILLOT (1920). — La phagocytose chez les insectes. *C. R. Soc. de Biol.*, **83**, p. 425.
- 59] PAILLOT (1921). — Mécanisme de l'immunité humorale. *C. R. Académie des Sciences*, **172**, p. 397 et 546.
- 60] PAILLOT (1921). — Influence de la température sur le mécanisme de l'immunité humorale chez les insectes. *C. R. Soc. de Biol.*, **84**, p. 737.
- 61] PAILLOT (1929). — La symbiose bactérienne et l'immunité humorale chez les insectes. *C. R. Académie des Sciences*, **188**, p. 1113.
- 62] PETTERSON. — Ueber die Bedeutung der Leucocyten bei der intra-per. Infection. *Centr. f. Bakt.*, **13**.
- 63] SALIMBENI (1909). — Les modifications des globules blancs dans l'immunité acquise. *Ces Annales*, **23**.

- [64] TATEIVA (1928). — La formule leucocytaire du sang des chenilles normales et immunisées de *Galleria mell.* *Ces Annales*, **42**, p. 791.
- [65] TOUMANOFF (1925). — La tuberculose expérimentale chez un Phasme. *C. R. Soc. de Biol.*, **92**, p. 14.
- [66] TOUMANOFF (1927). — Essais sur l'immunisation des abeilles. *C. R. Académie des Sciences*, **185**, p. 1078.
- [67] TOUMANOFF (1927). — Les maladies bactériennes du couvain des abeilles. *Bulletin de la Société d'Encouragement pour l'Industrie Nationale*.
- [68] VICHER (1928). — Contribution à l'étude de l'immunité chez l'insecte. *Thèse de Montpellier*.
- [69] ZERNOFF (1927). — L'immunité passive chez *Galleria mell.* *C. R. Soc. de Biol.*, **97**, p. 1697.
- [70] ZERNOFF (1927). — Sur la spécificité de l'immunité passive chez *Galleria mell.* *C. R. Soc. de Biol.*, **98**, p. 1500.
- [71] ZERNOFF. — Sur la nature de l'immunité passive chez les chenilles. *C. R. Soc. de Biol.*, **99**, p. 315.

LÉGENDE DE LA PLANCHE I

- FIG. 1. — Proleucocytes.
- FIG. 2. — Leucocytes ou phagocytes.
- FIG. 3. — Cellules sphéruleuses.
- FIG. 4. — Cellules sphéruleuses avec des sphérules incolores.
- FIG. 5. — Formation des sphérules.
- FIG. 6. — Destruction des cellules sphéruleuses.
- FIG. 7. — Destruction des cellules sphéruleuses six heures après l'injection de *Bacterium Thuringiensis*.
- FIG. 8. — Dégénération des cellules sphéruleuses.
- FIG. 9. — Formation des vacuoles dans les phagocytes après l'injection des *Bacterium galleriæ* n° 2.
- FIG. 10. — Globules du sang après l'injection des *Coccobacillus Ellingeri*.
- FIG. 11. — Globules du sang après l'injection de *Bacterium galleriæ* n° 2. Pas de phagocytose.
- FIG. 12. — Formation des cellules géantes deux jours après l'injection de bacilles tuberculeux.
- FIG. 13. — Formation des capsules et transformation des bacilles tuberculeux en un pigment brun.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MYCOSES OSSEUSES :
TROIS CAS D'OSTÉITES DUES D'UNE PART
A L'*ACTINOMYCES ASTEROIDES* (EPPINGER)
ET D'AUTRE PART A L'*HEMISPORA STELLATA* (VUILLEMIN)

par A. SARTORY, M. MEYER et J. MEYER.

On admet généralement que les mycoses osseuses constituent des affections d'une rareté exceptionnelle, surtout quand il s'agit de mycoses osseuses primitives. Au cours d'une année il nous a été donné d'isoler de trois cas d'ostéites, qui avaient été tous les trois auparavant considérés comme tuberculeux, des champignons inférieurs. Au cours de notre exposé nous nous proposons de démontrer que les espèces isolées peuvent être incriminées comme uniques agents d'infection et nous nous permettons de rendre attentifs les chirurgiens et les spécialistes des maladies tuberculeuses sur la fréquence, plus grande qu'on ne l'admet, des mycoses.

CAS N° 1.

Le malade est un jeune homme de dix-neuf ans, qui n'aurait jusqu'à présent jamais été souffrant. Rien de particulier n'a pu être signalé dans ses antécédents, ni dans ceux de sa famille. Un abcès au niveau du tibia droit, consécutif à un coup de pied, a mis un an à guérir. Deux ans après des douleurs surviennent après une chute, dans le genou gauche. Le malade est traité pendant deux mois par l'héliothérapie; la jambe est ensuite immobilisée durant six mois dans un pansement plâtré. Malgré le traitement et l'immobilisation absolue, l'enflure n'ayant pas disparu, le jeune homme se présente à nous le 18 octobre 1928. A l'auscultation, nous constatons que les organes internes sont normaux. A la jambe droite nous décelons une ancienne ostéite proliférante du tibia. La jambe gauche est fortement

enflée à partir du genou; l'œdème envahit le dos du pied. La pression occasionne une sensation douloureuse. immédiatement au-dessous de la rotule; à cette place la peau paraît un



FIG. 1. — Radiographie du genou du malade n° 1 vu de face. La radiographie permet de voir au milieu de l'épiphyse tibiale une pièce décalcifiée grande comme une pièce de cinq sous au centre de laquelle se trouve une petite lentille plus sombre.

peu violacée. Les articulations de la hanche, du genou, ainsi que de la tibio-tarsienne sont complètement libres. La région inguinale gauche montre un certain empâtement au milieu duquel les glandes inguinales se dessinent comme de très petits noyaux durs; un peu de douleur à la pression.

La radiographie permet de voir au milieu de l'épiphyse tibiale une place décalcifiée, grande comme une pièce de cinq sous, au centre de laquelle se trouve une petite lentille plus sombre. L'image radiographique présentait une grande différence avec l'aspect habituel des lésions tuberculeuses osseuses; nous recommandons l'opération (fig. 4).

Celle-ci nous permet de constater une vaste cavité remplie d'os ramolli, d'une substance interstitielle visqueuse et épaisse et de grains jaunes durs, petits et à contours irréguliers. La substance osseuse ne résiste nullement au bistouri et se comporte à la façon d'une éponge laissant sourdre une fongosité lorsqu'on la presse. Les prélèvements sont effectués d'une façon rigoureusement aseptique, puis nous badigeonnons à la glycérine iodoformée (10 p. 100) et nous pratiquons la suture du tendon rotulien et de la peau.

L'image macroscopique des éléments pathologiques présente l'aspect d'une ostéite raréfiante avec un ramollissement prononcé des parties osseuses calcaires.

L'examen microscopique du prélèvement chirurgical nous montre des granulations d'une consistance dure, à surface rugueuse, de dimensions variables de 40 à 250 μ , noyées dans une substance interstitielle visqueuse.

Pour approfondir l'examen, les débris osseux ont été fixés pendant douze jours dans le mélange d'*Orth.* Ensuite nous avons pratiqué la décalcification au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique alcoolique. L'examen histologique a été effectué par la coloration à l'hématoxyline-éosine. Il nous a montré un tissu osseux n'existant qu'à l'état de rares trabécules infiltrées largement par de nombreuses cellules conjonctives basophiles à noyau hypertrophié et de nombreuses fibres collagènes. En plus nous constatons d'abondants mononucléaires basophiles et de place en place des amas de polynucléaires. La moelle présente l'aspect fibro-cellulaire avec infiltration de nombreuses cellules graisseuses. Les vaisseaux sont parfois le centre de nodules d'infiltration plus ou moins compacts. Les éléments parasitaires sont colorés en rouge pâle; quand ils forment des grains intranodulaires, ils se présentent en rouge vif.

Le colorant triple de Guegen permet de mettre en évidence

des grains de structure radiée, dépourvus de massues et présentant naturellement une teinte jaune fixant électivement l'éosine (fig. 2).

CARACTÈRES BOTANIQUEs. — Sur milieu *jus de pomme de terre maltosé*, nous avons obtenu après quatre à cinq jours des colonies chétives, qu'il a fallu réensemencer tous les quatre jours



FIG. 2. — Grains actinomycotiques sans massues provenant de lésions humaines. (Grossissement : 1×120 .)

afin d'adapter l'organisme aux conditions culturales. Les cultures ainsi obtenues, examinées en goutte pendante, nous ont montré un mycélium fragile composé de filaments ramifiés par dichotomies successives, mesurant de $0 \mu 3$ à $0 \mu 6$ de largeur; des arthrospores de diamètre un peu plus grand mesurant jusqu'à 1μ étaient visibles. Ces éléments se colorent facilement au moyen de colorants d'aniline; ils restent colorés par la méthode de Gram; les arthrospores sont nettement acido-résistantes (fig. 3).

Les caractères biologiques étudiés sur les différents milieux peuvent être résumés de la façon suivante : le champignon est

une espèce pathogène et son *optimum cultural* est situé vers $+ 37^{\circ}$; il ne liquéfie pas la *gélatine* et ne pousse pas en profondeur sur ce milieu par ensemencement en piqûres; il ne liquéfie pas le *sérum* coagulé et ne coagule pas le *lait*, mais il produit sur ce milieu une peptonisation lente; sur milieu de *pomme de terre ordinaire* et sur *bouillon gélosé* acide, il donne des colonies mamelonnées, blanchâtres, prenant un aspect poudreux, gris jaunâtre avec l'âge. Les cultures sur *pomme de terre glycinée* et *jus de pomme de terre glyciné maltosé* présentent un aspect tout à fait caractéristique; des colonies de consistance très fermes, formant des masses coriaces très semblables à de petites éponges buissonneuses à surface irrégulièrement chagrinée; la teinte est au commencement brun ocreux et devient plus tard jaune pâle. Le milieu de Sabouraud *maltosé* est très favorable, donnant des colonies en voile compact, d'un blanc de neige, ne changeant de teinte que très tardivement. Sur tous ces milieux il ne se produit pas de dégagement gazeux, mais une odeur fétide très caractéristique surtout sur les milieux pauvres. En ce qui concerne l'assimilation des hydrates de carbone, nous pouvons exprimer les résultats obtenus par les chiffres suivants : maltose 6; glucose 4; saccharose 2; lactose et lévulose 0; la production d'*indol* fait défaut.

ACTION PATHOGÈNE EXPÉRIMENTALE. — Des inoculations ont d'abord été pratiquées au moyen d'une émulsion de prélèvements pathologiques en eau physiologique (3 grammes sur 10 cent. cubes de sérum) par voie sous-cutanée chez un lapin et chez deux cobayes. Dans la première quinzaine suivant l'opération, nous n'avons pu, à part une petite induration, observer ni réaction ni symptôme pathologique. En employant du matériel de culture pour l'inoculation, nous avons obtenu des résultats beaucoup plus démonstratifs, et ceci très probablement parce que la quantité de produit pathogène inoculé est sensiblement plus massive et que l'on a affaire à une race jeune.

Cinq cobayes ont été infectés par voie sous-cutanée au moyen d'une émulsion de culture dans du sérum physiologique (2/10). Chez deux de ces animaux nous avons pu observer de petites tumeurs dures, de la grosseur d'une noisette, qui

par la suite sont devenues molles, et sans que la peau se soit ouverte elles se sont résorbées, de sorte qu'au bout de quatre semaines les symptômes se sont effacés; les animaux ont gardé leur bon appétit et ont survécu.

En ce qui concerne les trois autres cobayes, nous avons assisté tout d'abord à la même formation de tumeurs; mais, au lieu de se résorber, celles-ci, tout en se ramollissant, donnent

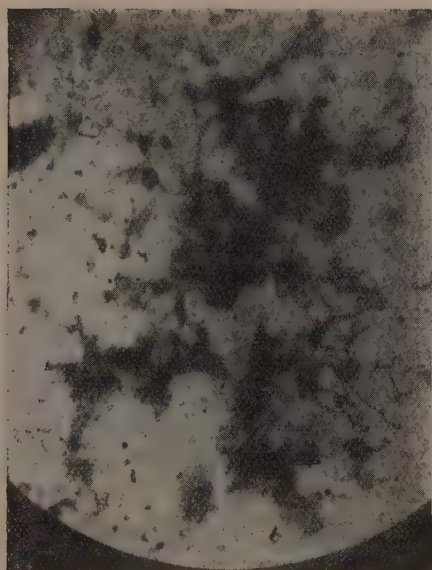


FIG. 3. — Aspect microscopique des filaments mycéliens sur milieu de Sabouraud maltosé liquide avec des arthrospores en formation. (Grossissement: 1×1.800 .)

naissance à des infiltrations avoisinantes, qui, par la pression, roulent sous le doigt. Ces tumeurs augmentent encore de volume tout en laissant la peau intacte. Au commencement de la cinquième semaine, nous avons pratiqué une incision au niveau de ces tumeurs et extirpé le contenu; les points de contact de la tumeur et du tissu épithélial sont bien nettement délimités; les muscles sont de cette façon légèrement écartés et ils passent en différents endroits au-dessus de ces tumeurs. Celles-ci, examinées histologiquement, offrent l'aspect d'abcès multiloculaires et elles renferment une masse homogène serrée

blanc jaunâtre. Absence complète de grains, mais présence de nombreux foyers miliaires. Les frottis montrent des déchets cellulaires, des restes de leucocytes, des filaments très courts et entremêlés.

Un de ces trois animaux présentait aussi une induration qui augmentait de volume, mais qui restait très dure ; nous avons pratiqué une incision artificielle au bout de la cinquième semaine et nous avons pu retirer un conglomérat de couleur jaune brique, de consistance très dure et formé par une gangue de filaments mycéliens enchevêtrés et durcis. Cette formation était entourée d'un épithélium fortement congestionné, fibreux à la périphérie, sauf à la base où se trouvaient des petits foyers rougeâtres et purulents.

Les prélèvements effectués sur les tumeurs de ces trois animaux ont étéensemencés sur milieu de Sabouraud *maltoisé* ; les cultures ont toujours montré un caractère de pureté et nous ont donné le parasite incriminé.

Un sixième cobaye a été inoculé par voie intrapéritonéale au moyen de 2 cent. cubes à 0,5/10. L'animal a succombé au bout de trente-deux jours ; à l'autopsie, presque tous les organes viscéraux étaient lésés, le foie est hypertrophié et farci de nodules de la grosseur d'une tête d'épingle d'une coloration brun-noir, qui, histologiquement, étaient constitués par de petits foyers leucocytaires nécrotiques entourés d'un tissu enflammé et il renfermait de nombreux petits grains actinomycosiques typiques (fig. 4). Les reins étaient normaux ; dans les poumons, des nodules inflammatoires sans caractères histologiquement spécifiques, ici l'élément inflammatoire prédominant est la cellule épithélioïde et des cellules alvéolaires enflammées. La rate présentait des dispositions folliculaires non spécifiques.

Dans les nodules on a pu mettre en évidence le parasite isolé à aspect filamenteux ou en glomérules enchevêtrés, mais nulle part nous n'avons pu, dans nos coupes ou dans les préparations obtenues par dilacération, voir des grains en *massue*.

Deux autres cobayes inoculés en même temps par voie intrapéritonéale ont montré au début une diminution de poids, mais on n'a pu trouver aucun autre symptôme de maladie ; nous les avons sacrifiés neuf semaines après l'inoculation sans pouvoir constater des lésions pathologiques.

Il nous semble que nous avons le droit de conclure à la pathogénicité du champignon isolé de la lésion humaine d'après ces résultats expérimentaux. D'autre part, n'ayant pu obtenir des lésions osseuses au cours de ces expériences, nous avons procédé à des inoculations intra-osseuses chez le chien ; à cet effet, nous avons eu recours à la technique suivante :

Le chien a été mis en anesthésie générale ; on a fait une incision aux deux pattes de derrière, puis au moyen d'un très fin perforateur on a trépané le tibia des deux jambes et nous avons

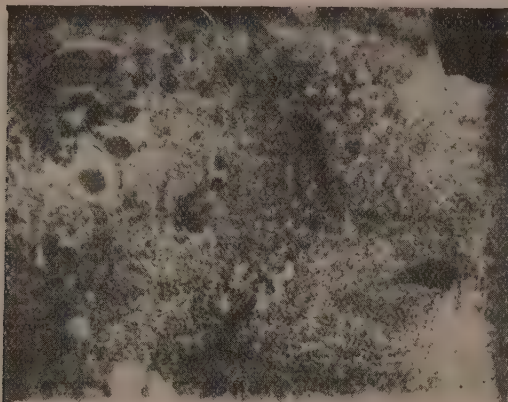


FIG. 4. — Coupe du foie d'un cobaye actinomycosique. Coloration Hémalum-Eosine. Les vaisseaux présentent des parois très épaissies infiltrées ; les éléments parasitaires formant soit des grains intranodulaires de forme variable, soit des grains libres à structure radiée typique. Ces grains sont toujours dépourvus de massues et fixent électivement l'éosine (Leitz objectif 3 + oculaire Makam).

injecté dans le trou une petite quantité de culture dans un des tibias, l'autre nous servant comme témoin pour contrôler : 1° l'asepsie de notre manipulation ; 2° la différence de l'évolution de la lésion osseuse cliniquement et radiographiquement. Les opérations ont été effectuées avec la plus stricte asepsie. Les plaies ont été suturées et un pansement plâtré a été fixé. L'évolution de l'infiltration des éléments parasitaires dans le tissu osseux peut être bien contrôlée sur les différentes radiographies effectuées périodiquement. L'affection a évolué pendant cinq semaines et la lésion a progressé. Au bout de ce temps, par la radiographie, nous assistons à une résorption

progressive du foyer parasitaire, et après soixante-dix jours, nous n'avons plus pu constater de différence entre les deux jambes.

TRAITEMENT POST-OPÉRATOIRE DU MALADE. — Après l'opération et le badigeonnage à la glycérine iodoformée on a effectué au malade un pansement plâtré. A partir du 22 octobre, la température vespérale, qui s'élevait les jours précédents à $+38^{\circ}$, revient à $+37.2$ et s'y maintient pendant toute la durée du traitement. Le 29 octobre, les fils sont enlevés, la plaie est complètement guérie *per primam intentionem*; l'enflure a disparu.

Le malade quitte l'hôpital le 30 octobre et retourne dans ses foyers. Toutefois l'empâtement dans la région inguinale persiste. Après avoir posé le diagnostic d'*actinomycose*, nous avons encore jugé utile de procéder avant le départ du malade à une sporo-agglutination vis-à-vis de *Sporotrichum Beurmani* (séro-diagnostic de Widal et Abrami [1]). Nous avons employé un fragment volumineux de *Sporotrichum Beurmani* cultivé sur gélose glucosée et âgé de deux mois; nous l'avons broyé et incorporé doucement à du sérum physiologique stérile à 8 p. 1.000 pour avoir une émulsion légèrement trouble de 130 à 150 spores par champ microscopique (oculaire, 4; objectif 8 Stiasnie). Les dilutions employées ont été les suivantes : 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/500, pour le sérum du malade : l'agglutination a été très nette jusqu'à la dilution à 1/100; elle se produisait encore avec des caractères douteux à la dilution de 1/150.

Une semblable épreuve effectuée avec l'*Actinomyces asteroides*, variété *serratus*, a été également positive.

Nous recommandons au médecin traitant de continuer une médication iodée, comprenant des injections intraveineuses d'un produit iodé et l'ingestion d'iodure de potassium à doses croissantes et continuelles.

Nous avons revu le malade le 25 janvier 1929 et constaté que la guérison de la jambe se maintient et que l'empâtement inguinal a considérablement diminué; la radiographie de contrôle permet de constater la disparition complète du foyer de décalcification qui semble remplacé par de l'os normal.

CONCLUSIONS THÉRAPEUTIQUES ET CLINIQUES. — Nous trouvant en présence d'une lésion osseuse dont l'image radiographique présentait une grande différence avec l'aspect habituel des lésions tuberculeuses osseuses, d'autre part, ayant constaté l'absence d'une adénopathie caractéristique prononcée, nous avons pensé à une mycose osseuse.

On a pu par les divers examens pratiqués à cet effet mettre en évidence le parasite, dont l'étude botanique et biologique nous a montré tous les caractères d'un *Actinomyces*; cette étude a été contrôlée par des constatations expérimentales, par inoculation aux animaux et des réactions biologiques.

Le traitement iodé, employé comme suite à ces constatations, a amené la guérison du malade contrôlée par les examens cliniques et radiographiques.

Nous nous trouvons ici en présence d'une *actinomybose* osseuse primitive démontrée :

1° Par l'absence de toute lésion organique autre que celles intéressant le tissu osseux et la déficience d'une adénopathie caractéristique prononcée;

2° Par les examens cultureux et biologiques, qui ont été toujours spécifiques;

3° Par la reproduction des lésions par expérimentation sur les animaux.

Cette *actinomybose osseuse* primitive a eu sa porte d'entrée à la jambe droite et, après une évolution qui s'est terminée par la guérison spontanée de cette jambe, l'infection, après une période latente de trois ans, s'est propagée par voie hémato-gène à la jambe gauche, où elle a déterminé sur l'os de prédilection (tibia) des mycoses osseuses, une lésion à symptômes cliniques et radiologiques caractéristiques et guérissable par le traitement iodé.

L'organisme isolé de cette lésion osseuse présentait les caractères suivants :

1° Mycélium fragile, composé de filaments nettement ramifiés par dichotomies successives, dont le calibre est inférieur à 1 μ . Le mycélium se brise fréquemment au niveau des cloisons qui apparaissent secondairement comme phénomène préliminaire de la fragmentation et forment ainsi des éléments bacilliformes. Arthrospores en chaînettes, plus épaisses que les filaments

mycéliens, naissant au sommet d'hyphes aériennes spéciales;

2° Actinomyces à grains jaunes sans massues, présentant dans les cultures âgées sur milieux solides un aspect poudreux, exhalant une odeur fétide. Présence d'organes acido-résistants; ne liquéfiant pas la gélatine, ni le sérum coagulé:

3° Espèces pathogènes.

De ces constatations il ressort que le champignon isolé rentre d'après Langeron [2] dans le groupe des *Microsiphonés*, genre *Actinomyces* Harz, sous-genre des *Euactinomyces*; section des *Parasitici*, sous-section des *Minores*.

4° Le parasite étudié, produisant une actinomycose osseuse à grains jaunes sans massues, forme des filaments, restant colorés par la méthode de Gram et des éléments *acido-résistants*. Les cultures sur gélatine et sur sérum solidifié sont positives sans liquéfaction du milieu et les colonies ont une couleur caractéristique. Ces caractères le rapprochent d'*Actinomyces asteroides* Eppinger. Le tableau suivant exprime les caractères comparatifs entre ces deux organismes :

ACTINOMYCES ASTEROIDES

ACTINOMYCES ÉTUDIÉ (VAR. SERRATUS).

Filaments :

Fragiles, ramifiés, se segmentant facilement. Largeur : 0 μ 2.

Fragiles, ramifiés, se segmentant facilement. Largeur : 0 μ 3 à 0 μ 6.

Gélatine :

Ne la liquéfie pas, ne pousse pas en profondeur.

Ne la liquéfie pas, ne pousse pas en profondeur.

Gélose :

Colonies blanchâtres, verruqueuses, devenant ocracées avec l'âge, confluentes en une pellicule plissée.

Colonies blanchâtres, verruqueuses, devenant ocracées avec l'âge, confluentes en une pellicule plissée.

Sérum :

Pas de liquéfaction.

Pas de liquéfaction.

Lait :

Pas de coagulation.

Pas de coagulation, mais peptonisation lente.

ACTINOMYCES ASTEROIDES

ACTINOMYCES ÉTUDIÉ (VAR. SERRATUS)

Pomme de terre :

Petites colonies verruqueuses, blanches, puis rouge brique.

Colonies affectant une forme mamelonnée, blanchâtres, grumeleuses, prenant un aspect poudreux, gris jaunâtre.

Les caractères cultureux de l'organisme en expérience sur *pomme de terre glycinée*, sur milieu de Sabouraud *maltosé* et *jus de pomme de terre glyciné maltosé*, rapprochent notre espèce de l'*Actinomyces convolutus* Chalmers et Christopherson par sa coloration et par la forme de ses colonies en petites éponges buissonneuses : par contre, les deux organismes diffèrent par leur action sur le *sérum*.

Après avoir parcouru toute la littérature ayant trait à cette question, nous croyons être en droit de considérer le champignon étudié comme une variété de l'*Actinomyces asteroides*. Nous proposons le nom d'*Actinomyces asteroides*, variété *serratus* [3].

CAS N° 2.

En juillet 1928 nous avons soumis à l'Académie des Sciences un autre cas de Mycose osseuse : en outre un travail plus détaillé sur cette question a paru dans le *Bulletin des Sciences Pharmacologiques* [4].

Nous donnons ci-dessous la description de ce cas observé dans le service orthopédique de la clinique chirurgicale B de la *Faculté de Médecine de Strasbourg*.

G. P..., actuellement âgé de douze ans et qui a habité jusqu'à présent Paris, nous est amené le 13 janvier 1928 pour douleurs dans la région malléolaire externe droite. Ces douleurs auraient débuté en janvier 1926 après une chute que l'enfant aurait faite en jouant. L'enfant a toujours habité la région parisienne, n'a jamais été dans les colonies ; personne de sa famille n'y a séjourné ; quelques jours après la chute, les parents auraient remarqué un gonflement de la région malléolaire externe, gonflement qui aurait disparu spontanément après quinze jours pour réapparaître vers la fin du mois de février 1926. Amené à une consultation hospitalière à Paris, on aurait irradié la jambe trois ou quatre fois par les

rayons X; ensuite les deux jambes auraient été immobilisées dans des bottes de cellulose et l'enfant aurait été envoyé à *Berck*, où il aurait séjourné complètement allongé jusqu'au mois d'octobre 1927: pendant ce temps, une fistule s'était produite au talon gauche; elle aurait guéri spontanément après quelques mois, aucun changement ne se serait manifesté dans l'état du malade consécutivement à ce traitement; aucune amélioration ni aggravation n'ont pu être observées.

Nous avons fait les constatations suivantes: Enfant de constitution et de grandeur conformes à son âge; organes internes en ordre. La région malléolaire externe droite présente une tuméfaction de 7 centimètres de longueur sur 2 centimètres de largeur qui suit le péroné. La peau est intacte, mais un peu violacée. La pression provoque une forte douleur. Toutes les articulations sont complètement libres, tous les mouvements sont possibles, pas d'adénite inguinale.

L'enfant boite fortement en posant son pied en valgus. La plante du pied gauche montre sous le calcaneum une petite cicatrice blanche sans aucune réaction inflammatoire et sans douleur à la pression.

La radiographie nous montre:

1° Une zone de décalcification en forme de kyste de la grandeur d'une lentille dans la partie postérieure inférieure du calcaneum droit. Cette zone de décalcification est entourée d'une enveloppe condensée (fig. 5);

2° Un foyer semblable dans la malléole externe correspondant à la région enflée;

3° Un troisième foyer dans la ligne épiphysaire de la malléole interne;

4° Un foyer correspondant au n° 1 dans le calcaneum gauche à l'emplacement de la petite cicatrice.

Toutes ces lésions ne donnent pas l'impression d'une bacillose, mais plutôt d'une ostéite kystique ou fibreuse.

Vu le peu de résultats obtenus par le traitement héliothérapique et le repos absolu, nous pratiquons le 7 avril en anesthésie générale la trépanation du péroné droit. L'incision nous mène directement sur le péroné; l'os est très dur et résistant, macroscopiquement il ne semble pas altéré; nous ne constatons aucun ramollissement et pas de kyste. Nous pratiquons

l'ablation de toute la partie qui correspond au foyer décalcifié de la radiographie.

EXAMEN MORPHOLOGIQUE DU PRÉLÈVEMENT. — L'examen micros-



FIG. 5 — Radiographie du pied droit du malade n° 2. On voit une zone de décalcification en forme de kyste de la grandeur d'une lentille dans la partie postérieure inférieure du calcanéum. Cette zone de décalcification est entourée d'une enveloppe d'os condensé.

copique direct du prélèvement chirurgical, effectué d'une façon rigoureusement aseptique, ne nous a rien montré d'anormal de prime abord ; aucun grain caractéristique de mycétome n'a pu être observé. Nous avons ensuite eu recours au procédé suivant : les débris osseux ont été fixés pendant douze heures dans le

mélange d'Orth; après lavage, les particules osseuses sont décalcifiées. Le matériel pathologique a été traité par la potasse et les coupes ont été pratiquées et examinées directement au microscope; elles nous ont montré des lamelles à cristallisation tubulaire, résidus des parties calcaires, particulièrement visibles à la périphérie des foyers, dans la zone interne desquelles on pouvait voir des corpuscules mycéliens plus ou moins arrondis, hyalins, granuleux, à membrane épaissie, brun foncé, très durs et des éléments cellulaires autres polymorphes à membrane jaune. D'autres coupes ont été colorées pendant douze heures au moyen de la solution de *Giemsa* à 1/10 et différenciées à l'acide acétique au 1/4. Dans ces préparations nous avons pu constater que les corpuscules mycéliens étaient localisés dans la région entre le périoste et l'os compact et dans la partie médullaire. Ainsi donc le champignon semblait végéter surtout dans les régions les moins résistantes de l'os et paraissait former une zone fortement sclérifiée, résistante à l'action décalcifiante autour de l'os compact. Par coloration à l'éosine, nous avons noté la présence de nombreux éléments sphériques de dimensions irrégulières, qui possédaient une affinité élective pour ce colorant. Au moyen d'une coloration effectuée par le triple colorant de Guegen, nous avons pu constater la richesse en matières grasses des tissus non ossifiés: nous pouvons donc conclure à une exagération considérable des graisses en considérant la jeunesse de notre malade.

CARACTÈRES CULTURAUX. — Les particules osseuses ont été broyées aseptiquement en présence de sérum physiologique stérilisé, l'émulsion ainsi obtenue a étéensemencée sur divers milieux alcalins et acides. Les milieux alcalins usuels comme le bouillon de viande, la gélose au bouillon, la gélose au sang, de même que des milieux spécifiques à base de jus de pomme de terre et de glycérine, sont restés rigoureusement stériles. Les milieux de pomme de terre et carotte naturels n'ont également pas donné de culture.

Sur le milieu de Raulin acide liquide, nous avons pu constater à + 37° et au bout de vingt jours la formation d'une aréole spongieuse autour des particules osseuses ensemencées, d'une coloration gris sale; sur milieu de Sabouraud *maltosé*, ense-

mencé au moyen de l'émulsion osseuse, le champignon a évolué de même, mais assez lentement et tardivement. Après trente à quarante jours, nous avons pu constater la présence de petites colonies blanches pouvant atteindre la grosseur d'une tête d'épingle et affectant la forme caractéristique de sclérote observé dans des cas de *Madurella*. Ces colonies s'étalent un peu en vieillissant, mais ne deviennent jamais très grandes. Par repiquages successifs sur différents milieux, servant à l'observation des caractères biologiques, il nous a été donné de constater les faits suivants ; pas d'évolution sur la *gélose ordinaire* : sur *gélatine* production d'un pigment brun, mais pas de liquéfaction. La production d'*indol* fait défaut sur *eau peptonée*. Evolution assez bonne sur milieux glucosés, très peu marquée sur milieux lactosés et saccharosés, pas de croissance sur milieu à base de lévulose ; liquéfaction du *sérum* coagulé ; sur milieu de *lait* la coagulation se produit à partir du quatrième jour, mais le coagulum formé ne se liquéfie plus ; donc production de présure, absence de caséase. Sur les milieux *maltoisés* bon développement avec formation de sclérotas. Par la triple coloration de Guegen ces cultures présentent les caractères *morphologiques* suivants :

Pas de formations conidiennes, ni sexuées constatables ; les colonies blanches sont constituées par des éléments cellulaires filamenteux cloisonnés de $3\ \mu$ à $6\ \mu$ d'épaisseur et d'éléments isolés plus épais souvent renflés en chlamydospores terminales rarement intercalaires renfermant un gros noyau, de nombreux corpuscules graisseux et entourés par une membrane résistante et épaisse ; rarement nous avons pu observer des éléments cellulaires en rosace, se colorant par le triple colorant de Guegen en violet foncé intense et chez lesquels la graisse fait défaut. Ces corpuscules varient de $10\ \mu$ à $32\ \mu$ de diamètre. Tels sont les faits observés par nous au cours de nos premières recherches. Un nouveau cas que nous décrirons plus loin survenu entre temps, et qui orienta nos expériences dans une nouvelle voie, nous aida dans l'élaboration du diagnostic définitif.

Nous avons pu trouver les observations suivantes de Caraven [5] sur une hémisporose osseuse ; qu'il nous soit permis ici de comparer dès à présent ces données avec nos premières observations que nous venons d'exposer :

Observations particulières.

CAS PERSONNEL

CAS DE CARAVEN

Contamination :

Chute, jambe droite lésée, l'infection se porte à la jambe gauche.

Cause d'infection inconnue, début par douleurs au niveau du genou gauche. Trois mois plus tard douleurs au genou droit et tuméfaction qui reste localisée au tibia droit.

Peau :

Intacte, un peu violacée.

Intacte, légèrement rosée.

Réaction :

Douleur à la pression.

Douleurs vives au niveau de l'hyperostose.

Glandes :

Pas d'adénite.

Fistules :

Existait au début, guérit spontanément.

Aspect clinique :

Os très dur; pas de ramollissement, ni kystes, ni pus.

Os doit être attaqué au ciseau et au maillet. Périoste épaissi, entre lui et l'os proprement dit une couche mince d'un tissu mou. Moelle diffuse. En aucun point du pus.

Examen microscopique :

Pas de grains.

Pas de grains.

Examen histopathologique :

Foyers nettement circonscrits dont la périphérie est calcifiée et zones fortement sclérifiées autour de l'os compact. Présence dans les foyers, dans les parties molles de l'os de corpuscules mycéliens plus ou moins arrondis, granuleux, à membrane épaisse. Présence d'éléments éosinophiles en grand nombre et de matières grasses non ossifiées.

Ostéite raréfiante avec réaction fibrocellulaire et sclérose jeune de la moelle. Parasites absents; de toutes petites fongosités molles et pâles.

Expérimentalement : Ostéite à la fois raréfiante et hypertrophiante et médullite fibrocellulaire. La moelle est restée vacuolée de ses cellules graisseuses. Dans les nodules anciens la sclérose prédomine, le centre très réduit est encerclé d'un anneau épais de sclérose dense.

CAS PERSONNEL

CAS DE CARAVEN

Caractères cultureux :

Raulin acide et Sabouraud maltosé à $+37^{\circ}$ petites colonies blanches atteignant la grosseur d'une tête d'épingle. Sur gélatine pas de liquéfaction, pigment brun.

Toutes les cultures ont été faites à la température du laboratoire. Les cultures à l'étuve sont difficiles et maigres et il faut habituer lentement le parasite pour le cultiver à $+37^{\circ}$.

Sur gélose glucosée peptonée de Sabouraud petites colonies d'un point blanc brunâtre de 2/10 à 3/10 de millimètre. Très rapidement la colonie grossit, devient globuleuse et noire, mais elle ne dépasse pas 2 à 3 mm. Sur gélatine pas de liquéfaction, colonies à carapaces écailleuses, pigment brun.

Caractères morphologiques :

Filaments cloisonnés de 3 à 6 μ d'épaisseur. Rarement des éléments cellulaires en rosace, se colorant par le Guegen en violet foncé, mesurant environ 30 μ .

Filaments septés de 2 à 3 μ : les spores sont des cellules arrondies à parois épaisses et granuleuses mesurant jusqu'à 3 μ . Les spores en germination sont énormes, sphériques, atteignant quatre à six fois le diamètre d'une spore ordinaire. Les éléments en rosace n'ont pas été observés.

Trailement :

Guérison par iode et iodoforme.

Guérison par badigeonnages et ingestion d'iode.

En comparant les observations relatives aux deux cas envisagés dans ce tableau, on constate immédiatement leur grande analogie. De part et d'autre les constatations anatomo-pathologiques sont tout à fait identiques. Quant aux caractères morphologiques et cultureux du parasite, nous insistons tout d'abord sur les difficultés rencontrées par Caraven pour obtenir des cultures de l'organisme à $+37^{\circ}$ et l'auteur mentionne aussi les modifications assez profondes qui interviennent dans ces conditions. On comprendra alors plus facilement les caractères que nous avons donnés et les différences qui semblent exister entre la description de Caraven et la nôtre. Toutes les propriétés signalées par nous ont été déterminées à une température de $+37^{\circ}$. Nous étions partis du principe que les

organismes pathogènes pour l'homme doivent être de préférence cultivés à $+ 37^{\circ}$. C'est en étudiant notre troisième cas qui présentait de grandes analogies avec le cas présent, et après avoir parcouru toute la littérature relative à cette question, que nous nous sommes inspirés de Vuillemin [6], Gougerot et Caraven [7]. En pratiquant alors des cultures à la température du laboratoire, nous avons en effet pu suivre l'évolution de nos cultures primitivement chétives vers des formes classiques. Faisons remarquer ici que, même à $+ 37^{\circ}$, l'organisme a montré dans ces éléments les plus stables un caractère de fixité, ce qui permet d'entrevoir encore les rapports étroits entre notre parasite et celui de Caraven.

Nous nous permettons encore de revenir sur deux faits tout à fait intéressants; nous avons, par la culture à $+ 37^{\circ}$, en partant des prélèvements pathologiques, pu constater la présence d'éléments cellulaires en rosace très caractéristiques, qui ressemblent par leur forme tout à fait aux disques étoilés vus par Vuillemin. L'auteur décrit ces éléments de la façon suivante: disques réguliers légèrement saillants, à contours circulaires ou polygonaux, dont les plus grands atteignent 2 mm. 5 de diamètre. Sur la trame semblable à celle du support, se dessinent en relief des côtes rayonnantes de couleur brune, plus ou moins confluentes entre elles: l'ensemble a l'aspect d'une marguerite ou d'une étoile.

Parlant ensuite de la classification du champignon, Vuillemin déclare: Si notre champignon offrait un aspect régulier et élégant dans les conditions de développement spontané, où il s'est d'abord présenté à notre observation, comme un disque blanc de 0,5 à 2 mm. 5 de diamètre, sessile, couvert de conidiophores dessinant à leur surface des étoiles ou des marguerites d'un brun fuligineux en relief, il n'offrait dans les cultures qu'une croûte contournée et cérébriforme, comme en donnent les simples *Mucédinées*.

Les colonies spontanées se développant en association avec l'*Aspergillus repens* avaient donc adopté une forme régulière, qui semble définitive sous les conditions données, mais aussitôt l'*Hemispora* isolé et cultivé à l'état de pureté, les caractères qui, comme dit Vuillemin, évoquent l'idée d'une fructification définie et rappelant un hyménium, disparaissent et les cultures

évoluent sous la forme incomplète d'une *Mucédinée*. C'est donc à une propriété d'adaptation à caractères non encore fixés que nous avons affaire et l'*Hemispora* semble seulement amené à la production de ces éléments, quand il est en état de souffrance ou plutôt de lutte, état particulier, se réalisant lors de la végétation spontanée observée par Vuillemin, alors qu'il était en quelque sorte greffé sur le thalle de l'*Aspergillus repens*.

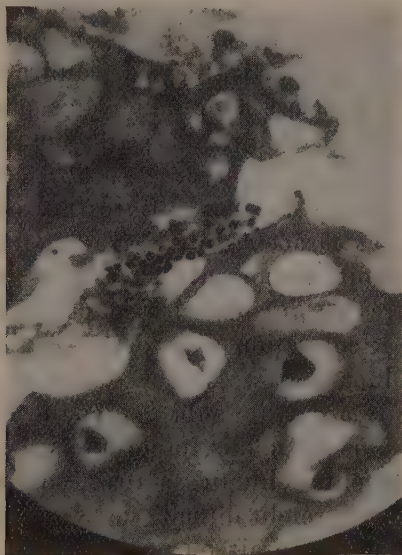


FIG. 6. — Coupe histologique de l'os du malade n° 2. (Grossissement d'une localisation parasitaire) [Leitz objectif 7 + oculaire Makam].

Caraven ne semble pas avoir observé ces disques en forme de marguerite. La description et la photographie qu'il donne des colonies cultivées sur lame sèche ne peuvent pas être comparées avec ces éléments et l'auteur lui-même le spécifie en déclarant : *cet aspect étoilé* des colonies sur culture *artificielle* justifie une fois de plus la dénomination de Vuillemin.

Nous avons, dans le cas présent, pu voir le développement du champignon sous sa forme caractéristique et définie, à aspect d'une marguerite ou d'une étoile, lors de nos premières cultures résultant directement de l'ensemencement des prélèvements pathologiques, et sans nous rendre compte de l'iden-

tité du champignon, nous avons fait remarquer dans notre première communication la présence d'éléments cellulaires en rosace, se colorant par le triple colorant de Guegen en violet foncé intense et chez lesquels la graisse fait défaut.

Ce qu'il faut mentionner, c'est la différence de dimension entre les disques de nos observations et ceux de Vuillemin; mais si on compare les figures que nous avons pu dessiner au moyen de la chambre claire, avec celles de Vuillemin, on constate la grande analogie, et il ne semble pas douteux que l'organisme isolé des lésions pathologiques, adapté par conséquent aussi à des conditions particulières de souffrance et de lutte, et cultivé à $+ 37^{\circ}$, a encore adopté dans les premières cultures son aspect régulier et défini. Mais ce phénomène, par suite des modifications profondes consécutives à la culture, est resté éphémère, et bientôt dans les cultures de repiquages les formations astéroïdes caractéristiques avaient disparu.

Le deuxième point important est la mise en évidence d'éléments parasitaires *in situ* dans les coupes histologiques après décalcification et coloration appropriée (fig. 6). Ces éléments sont pour la plupart, d'après leur forme et dimension, des spores de l'*Hemispora* ayant subi des modifications (membrane et cytoplasme) plus ou moins importantes. La présence, outre ces spores, d'éléments cellulaires autres, polymorphes, à membrane jaune, nous a rendu difficile de prime abord l'identification du parasite; on aurait pu penser à une *Maduromycose*. C'est seulement lors de l'étude de notre troisième cas que nous avons été amenés, par la culture à la température ordinaire, à poser le diagnostic d'*Hemisporose*. Nous donnons ci-contre une photographie (fig. 7) se rapportant au parasite, qui permet facilement de se rendre compte de son analogie avec l'*Hemispora stellata* Vuillemin 1906. Malheureusement, vu le diagnostic tardif dans le cas présent, il nous a été impossible de pratiquer les épreuves de co-fixation d'après Widal au moyen de *Sporotrichum Beurmanni*. Mais la pureté des cultures obtenues sur les différents milieux et les expériences réalisées sur les animaux ne laissent pas de doute sur le caractère de la maladie.

EXPÉRIENCES SUR LES ANIMAUX. — Des cobayes ont été inoculés par voie sous-cutanée et intrapéritonéale au moyen du prélève-

ment pathologique mis en émulsion dans le sérum physiologique. La série inoculée par voie intrapéritonéale n'a jamais montré de symptômes caractéristiques d'une infection. Quant à la série traitée par voie sous-cutanée, nous avons pu constater l'apparition d'une glande inguinale au niveau du point d'inoculation dans la première semaine qui a suivi celle ci, mais déjà dans le courant de la troisième ou quatrième semaine



FIG. 7. — Aspect microscopique d'une culture en goutte pendante au milieu de Raulin acide du champignon isolé du cas n° 2. Coloration vitale au bleu de méthylène [Leitz objectif 7 + oculaire Makam].

cette manifestation a disparu. Chez un des animaux, il s'est cependant formé dans la suite un nodule induré localisé au point d'inoculation. Cette formation a persisté des semaines, le cobaye n'en semblait pas incommodé grandement et la résorption s'effectuait vers la treizième semaine sans production de suppuration ou de fonte gommeuse.

Nous avons ensuite pratiqué des inoculations au moyen de prélèvements cultureux obtenus à $+ 37^{\circ}$. Des injections par voie sous-cutanée ont été faites à 4 cobayes (0 gr. 1 de culture pour 2 centimètres d'eau physiologique).

L'aspect clinique était le suivant : aucune adénite ne s'est

produite chez les 4 animaux. Mais dans les 4 cas nous avons pu observer la formation de nodules locaux. Le temps d'incubation variait de neuf à vingt jours. Nous avons alors soit un nodule unique dur à contour irrégulier et d'un volume pouvant atteindre celui d'une noix, soit la formation simultanée de plusieurs nodules, de taille beaucoup plus petite, groupés en petites colonies au niveau du point d'inoculation et évoluant vers la forme d'abcès chronique. Nous avons sacrifié ces animaux après une période variant de trois à quatre mois. Chez les deux premiers, les nodules d'induration étaient alors nettement en voie de régression, tandis que pour les deux autres les phénomènes locaux avaient acquis un aspect chronique et stable. Mais à l'autopsie les 4 cobayes étaient exempts de lésions métastatiques, qui auraient pu survenir par propagation des germes pathogènes suivant la voie hématogène ou lymphatique; tous les organes internes et les tissus osseux, examinés avec beaucoup de soin, étaient vierges de toute contamination.

L'examen microscopique des nodules indurés nous montra un contenu homogène, dur, de couleur jaune sale et de zones brunâtres.

L'examen microscopique des prélèvements et des coupes faites au siège des nodules nous permit d'observer une infiltration de polynucléaires en très grand nombre.

A différents endroits, on trouve des corpuscules formés par des filaments courts et minces, très enchevêtrés et colorés en brun-jaunâtre, entourés d'une zone de polynucléaires et de macrophages; il en résulte un nombre considérable de petits abcès, qui sont des résidus non encore résorbés de l'injection parasitaire initiale. Mais à part ces formations peu intéressantes, nous avons noté la présence considérable d'éléments plus ou moins sphériques à double membrane, brun foncé, et mesurant de 3 à 6 μ . Ces sphérules sont isolés et sans aucune prolifération mycélienne. Leur forme et leur aspect sont tout à fait identiques à ces éléments que nous avons pu observer *in situ* à l'examen direct du prélèvement pathologique de l'os humain et viennent encore appuyer l'exactitude de notre diagnostic.

Si Caraven n'a pu mettre en évidence ces éléments dans ses

préparations histo-pathologiques humaines, il a cependant retrouvé les mêmes formations que nous, dans ces nodules d'expérimentation chez les animaux. Lui aussi a pu voir dans ces lésions des figures parasitaires de deux sortes : « Les unes agminées en paquets mycéliens, entrelacées, colorées en brun clair, sont manifestement des restes du parasite injecté. »

« Les autres formes parasitaires sont surtout représentées par des corpuscules arrondis extrêmement nombreux, brunâtres, de 3 à 5 μ . La ressemblance de ces éléments avec les corps sporulés des cultures artificielles ne permet pas d'affirmer qu'ils sont la forme *in vivo* du parasite ; ce peuvent être des spores entraînées et disséminées au loin par les phagocytes. Toutefois, leur nombre considérable, leur état d'isolement, l'absence de filaments mycéliens, nous porte à croire que ces parasites arrondis sont la multiplication *in vivo* du champignon. »

Nous n'avons rien à ajouter aux constatations de cet auteur. Nos résultats obtenus en partant de la souche issue de la lésion osseuse de notre malade sont rigoureusement identiques et l'homologie stricte des éléments parasitaires trouvés dans l'os humain avec ceux obtenus expérimentalement dans les nodules sous-cutanés et musculaires par Caraven d'un côté, par nous de l'autre, prouvent l'identité de l'agent pathogène et la certitude de notre diagnostic retardataire.

D'autre part, nous avons effectué au moyen de prélèvements cultureux un greffage dans le péroné d'un grand chien de berger. Pour cela, nous avons eu de nouveau recours à la technique décrite pour le cas de l'actinomycose. Les deux pattes de derrière ont été soumises à des interventions opératoires identiques, sauf que l'une a été infectée au moyen de particules culturelles de l'*Hemispora*, et l'autre refermée et pansée sans avoir subi une contamination artificielle. Ainsi, nous avons pu encore vérifier l'asepsie de nos manipulations et la marche de l'infection à l'intérieur de l'os.

Ici aussi, nous avons contrôlé fréquemment l'évolution de la maladie par des examens radiologiques. Ceci nous a permis de constater que l'infection osseuse a évolué nettement dans les cinq semaines. La zone d'infiltration d'abord minime augmente de semaine en semaine, de sorte qu'au trentième jour la lésion a pris une étendue de 60 millimètres de longueur. Elle

a évolué strictement à l'intérieur de l'os, et nous avons affaire à une ostéite pure. L'autre patte a guéri complètement pendant ce temps et l'image radiologique nous prouve l'asepsie de l'intervention chirurgicale et la spécificité de l'infiltration due à l'agent pathogène implanté.

Nous voyons donc que la reproduction des lésions osseuses a été possible, elle évolue suivant le mode et la technique d'inoculation employés : dans notre cas vers une ostéite pure chez le chien, dans le cas de Caraven vers une ostéo-périostite diaphysaire ou épiphysaire avec arthrite suppurée chez le lapin. Caraven a sacrifié ses animaux le vingt-neuvième jour de la maladie. Nous avons jugé utile de laisser évoluer les lésions et de suivre le phénomène radiologiquement. Ainsi, nous avons pu voir que l'extension et la netteté de l'infiltration avaient atteint leur maximum dans les cinquième et sixième semaines après l'inoculation ; à partir de cette époque, nous assistons à une régression successive de la zone sombre, et la résorption du parasite semble définitive dans la douzième semaine de la maladie. En effet, l'image radiologique est alors identique pour les deux pattes et le chien semble définitivement guéri.

TRAITEMENT DU MALADE. — Après trépanation du péroné droit et une fois les prélèvements effectués, nous avons pratiqué un badigeonnage massif à la glycérine iodoformée, puis la suture a été réalisée, et un pansement plâtré, allant des orteils jusqu'au genou, a été placé. Ce pansement a été enlevé après quatre semaines. L'enflure a complètement disparu, le malade ne ressent plus aucune douleur. Nous lui permettons la marche ; une nouvelle radiographie a été prise, qui prouve l'exactitude des observations cliniques : la guérison nette.

DOCUMENTATION. — Caraven termine son travail magistral dans les termes suivants : Des recherches systématiques retrouveront sans doute l'*Hemispora* dans d'autres lésions humaines, car ce parasite ne semble pas rare dans la nature. Mais nous ne saurions trop insister sur la nécessité d'une critique sévère des observations. Pour affirmer le diagnostic d'*Hémisporose*, il faut exiger : des cultures pures en partant de lésions germées ; des colonies nombreuses sur tous les tubes ensemencés et lais-

sés à froid, une coagglutination avec les spores du *Sporotrichum Beurmanni*, les fixations et cofixations sériques, en y joignant la preuve de la reproduction expérimentale.

Dans le cas que nous nous permettons de présenter ici, nous avons énuméré tous les points de concordance avec celui de Caraven. Si nous avons été amenés à une imprécision dans nos premières constatations, par la présence et l'aspect d'éléments mycéliens dans les prélèvements pathologiques osseux, par les caractères cultureux résultant d'une croissance à + 37°, et si nous avons omis d'exécuter à temps les différents essais de sérodiagnostic, nous ne nous croyons aujourd'hui pas moins en droit de pouvoir conclure à une *Hémisporose* osseuse primitive due à l'*Hemispora stellata* Vuillemin, et ceci pour les raisons suivantes :

1° Présence de corpuscules mycéliens dans les lésions humaines osseuses, identiques à ceux mis en évidence par Caraven et par nous dans les nodules cutanés et musculaires, expérimentalement obtenus chez les animaux ;

2° Présence de spores spécifiques et à caractères fixes et d'éléments cellulaires en rosace, identiques aux disques étoilés vus par Vuillemin dans des cultures à + 37° et en partant des prélèvements pathologiques ;

3° Cultivée à la température du laboratoire, nous avons une concordance absolue des propriétés morphologiques et biologiques de notre souche et de celles de Vuillemin et de Caraven ;

4° Analogie complète de nos constatations anatomo-pathologiques avec celles de Caraven, et avec un autre cas étudié par nous ultérieurement et dont le sérodiagnostic était positif ;

5° Vérification de la virulence de notre souche par les essais expérimentaux sur les animaux du laboratoire et reproduction des lésions typiques au niveau des tissus cutanés et osseux ;

6° Régression rapide et guérison définitive de la lésion humaine par le traitement iodé.

Nous pouvons donc reprendre nos conclusions antérieures en les complétant de la façon suivante.

CONCLUSIONS.

D'après les éléments caractéristiques trouvés, nous pouvons en nous reportant aux données de Langeron émettre les conclusions suivantes :

1° Affection amenant la production d'une tuméfaction au pied, à la suite d'un traumatisme, tuméfaction à allure chronique et à évolution très lente avec présence d'une fistule qui s'est guérie spontanément.

2° L'examen macroscopique ou microscopique des prélèvements pratiqués par trépanation, étant donné l'absence de pus, ne nous a pas permis de constater la présence de grains caractéristiques des mycétomes à *Maduromycoses*; nous pouvons conclure, par suite de l'existence d'éléments mycéliens de grande dimension, cloisonnés, à parois épaisses, à double contour et par la présence de corps éosinophiles, à un paramycétome, rentrant, selon la classification de Vuillemin [8], dans le groupe des *hyphomycétomes*, dont les grains n'ont pu être décelés, soit qu'ils fassent complètement défaut, soit que la maladie n'ait pas encore évolué jusqu'à ce stade.

3° La culture du parasite a été réalisée et les caractères morphologiques et biologiques viennent appuyer notre diagnostic.

4° La guérison du malade, contrôlée par les constatations cliniques et par l'examen radiographique, semble prouver que certaines *Maduromycoses* sont justifiables du traitement iodé qui peut donner de bons résultats.

5° Il existe donc en Europe des *mycoses osseuses primitives* (maduromycoses ou hyphomycétomes) décelables par les examens radiographiques et la technique bactériologique, et qui sont dues à l'*Hemispora stellata* Vuillemin.

CAS N° 3.

Le 18 octobre 1928, il nous est présenté un nouveau cas, à la clinique chirurgicale B de la *Faculté de Médecine de Strasbourg*, dont l'aspect clinique et radiologique nous paraissait suspect, ayant été diagnostiqué antérieurement comme tuberculeux.

Il s'agit d'une jeune servante El. Fr..., âgée de dix-neuf ans,

qui vient nous consulter pour une fistule s'étant établie à la partie externe du calcanéum gauche. Les antécédents héréditaires ne mentionnent rien d'anormal.

La malade a eu à l'âge de deux ans une suppuration au



FIG. 8. — Radiographie du pied gauche de la malade n° 3. On voit dans la masse du calcanéum une zone de décalcification de la grandeur d'une cerise, entourée d'une coque de condensation osseuse. On constate la grande analogie de cette photo avec celle du cas n° 2 (fig. 5).

3^e métacarpien gauche qui a évolué pendant quelques années et qui a finalement guéri avec un raccourcissement du médius. A l'âge de cinq ans, il s'est formé une nouvelle suppuration au niveau du coude gauche, qui a également nécessité un temps de guérison de plusieurs années. Huit ans plus tard la jeune fille fait une grippe avec phénomènes pulmonaires et depuis

cette maladie il s'est déclaré une surdité bilatérale qui a fait encore quelques progrès.

Il y a quelques semaines elle remarque sur le côté externe du talon gauche une petite suppuration s'établissant sans fièvre ni douleur. Depuis une huitaine de jours, des traces de pus s'écoulent par une petite fistule.

OBSERVATIONS. — La malade est une jeune fille de dix-neuf ans, de petite taille; les organes, notamment le cœur et les poumons, semblent parfaitement sains. Le médius déformé est plus court que les autres doigts; au coude gauche nous constatons une cicatrice adhérente au cubitus sans aucune réaction.

Le pied gauche présente dans le sillon rétro-malléolaire externe au-dessous de la malléole une zone d'inflammation chronique de plusieurs centimètres de diamètre. A la palpation, aucune douleur ne se fait remarquer sur toute la région. En comprimant la peau fortement au niveau de la fistule, on fait sourdre une gouttelette de pus jaunâtre grumeleux. Le stylet pénètre par la fistule jusqu'au calcanéum qui semble dénudé au toucher.

La radiographie décèle dans la masse du calcanéum une zone de décalcification de la grandeur d'une cerise entourée d'une coque de condensation osseuse (fig. 8).

Le diagnostic de tuberculose du calcanéum pouvait donc facilement être posé, mais étant donné la grande ressemblance de ce foyer avec celui que nous venons de décrire dans notre cas n° 2 nous avons jugé utile de prendre toutes les précautions nécessaires pour établir un diagnostic sûr.

Le 31 octobre 1928, nous pratiquons en anesthésie générale une incision curviligne jusqu'à l'os en contournant la fistule. Ayant ainsi mis à nu l'os, nous constatons une petite cavité, qui contient quelques gouttelettes de pus granuleux, jaune verdâtre, mais l'absence complète de fongosité et de tissu mou. Un grattage avec la curette ne nous permet pas de prélever des particules pathologiques, la curette glissant sur l'os condensé. Nous nous voyons donc obligés d'enlever les parois de la cavité au ciseau et au maillet. Après avoir ainsi pratiqué notre prélèvement et nettoyé rigoureusement la lésion, nous remplissons la caverne avec de la glycérine iodoformée.

EXAMEN MICROSCOPIQUE. — L'examen microscopique du contenu de la cavité et du pus ne nous a pas montré d'éléments parasitaires bactériologiques, ni cryptogamiques. Nous avons pratiqué des examens au moyen de préparations entre lame et lamelle et de frottis traités par des colorations simples, par les méthodes de Gram et de double coloration de Ziehl.

L'étude histologique du prélèvement faite par les méthodes de Giemsa et de May-Grünwald nous a montré que le pus était constitué par un très grand nombre de mononucléaires macrophages et de rares polynucléaires guère altérés. La méthode de décalcification nous a permis de constater que le siège de la cavité était d'origine centro-médullaire. Les couches osseuses avaient subi une forte réaction fibreuse. De place en place nous tombons sur de petits amas formés d'infiltration de cellules géantes et de polynucléaires englobés de tissu sclérosé très dense, où on rencontre encore très rarement des cellules géantes. Ce sont ces anneaux sclérosés qui forment une coque osseuse très résistante constituant un tissu de formation récente, développé aux dépens du périoste, au fur et à mesure que la partie centrale est résorbée par l'action du parasite. Les proliférations de cette capsule vers le centre de l'os donnent à la coupe souvent un aspect caverneux, mais il ne nous a pas été donné de mettre en évidence dans ces préparations histologiques des éléments parasitaires caractéristiques.

CARACTÈRES CULTURAUX. — Nous avons jugé utile de pratiquer des ensemencements en partant du pus et des prélèvements osseux. Ces recherches ont été effectuées dans les mêmes conditions que dans le cas précédent en employant les différents milieux alcalins et acides. Ces cultures effectuées à l'étuve à $+37^{\circ}$ sont restées rigoureusement stériles. Mais lors de notre examen direct nous avons placé des particules purulentes en goutte pendante sur milieu de Raulin *acide* dans la chambre humide. Ces préparations laissées à la température du laboratoire, reprises quatre jours plus tard, pour contrôler encore nos constatations antérieures, nous ont réservé une surprise. L'examen microscopique de toutes nos cultures en goutte pendante nous a permis d'observer la présence de petites colonies grisâtres qui s'étaient produites au cours de ces quelques jours.

Ce hasard nous a menés à effectuer nos cultures à la température du laboratoire et au bout de dix à douze jours nous avons alors obtenu sur tous nos milieux ensemencés avec les prélèvements pathogènes des colonies caractéristiques grisâtres ou brunes, suivant les milieux, de l'*Hemispora stellata* Vuillemin.

Entre temps (cinq jours après l'opération), nous avons fait une prise de sang à notre malade et pratiqué le sérodiagnostic de Widal et Abrami et la sporo-agglutination au moyen de *Sporotrichum Beurmanni*. Cette dernière était encore nettement positive à 1/400 et l'agglutination souvent microscopiquement encore contrôlable à la dilution de 1/800.

La réaction de Widal et d'Abrami donnait un résultat positif au moyen de la culture d'*Hemispora* et la cofixation du *Sporotrichum Beurmanni* était positive à II 1/2. L'hémoculture ne donnait pas de résultat.

Les expériences ayant pour but de contrôler l'action pathogène sur les animaux de laboratoire ont été effectuées en même temps et dans les mêmes conditions que pour le cas n° 2. Les résultats se sont montrés analogues et nous ne jugeons pas nécessaire d'y revenir.

TRAITEMENT. — Après le badigeonnage à la glycérine iodée post-opératoire et la confection d'un pansement aseptique, la fistule était complètement guérie le 22 novembre. Nous avons alors ordonné un traitement interne à l'iode de sodium à dose croissante et périodique. Nous revoyons la malade en janvier 1929 complètement guérie, sans récurrence jusqu'à ce jour.

CONCLUSIONS. — Ce cas dû à l'*Hemispora stellata* Vuillemin a été examiné avec tous les soins et suivant toutes les conditions posées par Caraven. Cliniquement, bactériologiquement et expérimentalement, nous avons pu constater que l'*Hemispora stellata* est l'agent pathogène exclusif d'une *ostéite mycosique*. Ce cas nous a permis en même temps de formuler un diagnostic sûr et définitif pour le cas n° 2, décrit antérieurement, où nous avions affaire à une mycose osseuse primitive aussi.

Ces deux observations nous prouvent : 1° l'exactitude des vues de Gougerot et Caraven, qui n'ont pas hésité, après avoir

accumulé toutes les preuves que nous avons ainsi pu revérifier, à définir et à démontrer cette nouvelle *mycose*.

2° L'existence d'*Hémisporose* osseuse primitive et le fait que tout os décalcifié n'est pas nécessairement tuberculeux. Nous avons par conséquent le devoir d'examiner les prélèvements osseux histologiquement, bactériologiquement et biologiquement aussi soigneusement et systématiquement que les crachats des malades atteints d'affections pulmonaires, car en considérant nos trois cas précités nous nous croyons en droit de conclure que les mycoses et surtout les mycoses osseuses sont beaucoup plus répandues qu'on ne l'admettait jusqu'ici, et notre but serait atteint si par le présent mémoire nous avons pu attirer l'intérêt des médecins radiologistes et chirurgiens-orthopédistes sur l'importance de ces diagnostics et sur la différence des symptômes radiologiques et cliniques existant dans diverses affections [9 et 10].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VIDAL et ABRAMI : Sérodiagnostic de la sporotrichose. *Bull. et Mém. de la Soc. des Hôp. de Paris*, n° 22, 19 juin 1908, p. 947; Ces *Annales*, n° 1, 1910.
- [2] LANGERON : Actinomycose. *Nouveau Traité de Médecine* Roger-Widal, fasc. IV, 2^e édition. Paris, Masson, 1925, p. 475.
- [3] A. SARTORY, R. SARTORY, J. MEYER : Un nouveau cas d'actinomycose à grains jaunes. *C. R. Ac. Sc.*, 11 février 1929.
- [4] A. SARTORY, R. SARTORY, J. MEYER : Etude d'un nouveau cas de mycose osseuse. *C. R. Ac. Sc.*, juillet 1928; Un cas de mycose osseuse guéri par le traitement iodé. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 35, 1928, p. 565.
- [5] CARAVEN : Ostéites et ostéo-arthrites mycosiques. *Thèse Méd.*, Paris, 1940.
- [6] VUILLEMIN : Un nouveau genre de Mucédinée, *Hemispora stellata*. *Bull. Soc. Mycol. de France*, 22, 2^e fascicule, 1906, p. 125.
- [7] GOUGEROT et CARAVEN : Mycoses nouvelles : l'*Hémisporose*, ostéites humaines primitives du tibia, dues à l'*Hemispora*, *Bull. Soc. Biol.*, 66, 20 mars 1909, p. 474; Hémisporoses humaines. *Revue de Chirurgie*, 29^e année, 1909, p. 915-920 et 30^e année, 1910, p. 66-89.
- [8] VUILLEMIN : Remarques sur les mycétomes. *Arch. de Méd. expér.*, 1919, 28, p. 446-451.
- [9] MEYER (Marcel) : Infections primitives osseuses d'origine mycosique, Congrès de la Société française d'Orthopédie, 11 octobre 1929.
- [10] M. MEYER et D. SICHEL : Etude radiographique d'un cas de mycose osseuse. *Journ. de Radiologie*, janvier 1930.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ DANS LA RAGE

par M. TZEKNOVITZER et I. GOLDENBERG.

(Institut Bactériologique de Kharkoff.)

Les travaux de George, Biglier-Villegas, Marie, Mutermilch, Remlinger et d'autres n'ont pas fourni de base expérimentale à la possibilité de l'existence d'une immunité locale dans la rage. Par contre, ceux de Spéransky ont attiré l'attention sur le rôle du système nerveux dans toutes sortes d'immunisations, générales et locales.

La prémunition de tout l'organisme contre la rage par l'immunisation du système nerveux central apparaît difficile en raison de l'incapacité complète du système nerveux, élaboré onto et philo-génétiquement, de lutter activement contre l'infection.

Nous exposons ci-après les résultats de quelques-unes de nos expériences par lesquelles nous avons pu comparer les effets de l'immunisation cutanée, sous-dure-mérienne, méningée, intracérébrale, intramusculaire et sous-cutanée chez les lapins. Nous présentons ces résultats de telle sorte que chaque série d'expériences soit groupée dans un tableau.

L'infection d'épreuve fut toujours effectuée avec 0 c. c. 2 de virus fixe en dilution à 1 p. 500. La dose infectante de ce virus fixe était de 0 c. c. 2 d'une dilution à 1 p. 20.000. La maladie des témoins était apparente le sixième jour après l'infection.

Les faits que nous avons obtenus sont insuffisants, quant à leur nombre ; mais on sait, surtout en ce qui concerne la rage, que les faits bien étudiés ont une grande valeur démonstrative.

A. — IMMUNISATION CUTANÉE DANS LA RAGE EXPÉRIMENTALE.

Deux vaccins antirabiques ont été préparés :

Vaccin n° 1 : le cerveau et la moelle de lapins infectés avec le virus fixe par voie sous-dure-mérienne et tués le sixième jour de la maladie sont soumis à la dessiccation à 22°C pendant quatre, trois et deux jours, émulsionnés dans de la glycérine, puis étendus d'eau physiologique jusqu'à dilution à 1 p. 25. 1 cent. cube de cette émulsion contenait 0,04 de substance cérébrale humide.

Vaccin n° 2 : Virus fixe sous forme d'émulsion de moelle, d'après Philips, glycinée et diluée à 1 p. 10. 1 cent. cube de cette émulsion contenait 0,1 de substance cérébrale humide.

TABLEAU I. — Résultats de l'immunisation par la voie cutanée.

Vaccination : par friction prolongée de la peau d'un côté (préalablement rasée), six fois, tous les deux jours, avec 3 cent. cubes de vaccin n° 1 ou n° 2.

Infection d'épreuve : sous-dure-mérienne (voir préambule), au bout de deux, quatre, sept ou douze semaines après la fin de la vaccination.

NUMÉROS des vaccins	QUANTITÉ de vaccin en milligrammes	LAPINS VACCINÉS	RAGE après vaccination	LAPINS VACCINÉS et infectés	RAGE après la première infection contrôle	IMMUNITÉ envers une première infection contrôle	DURÉE de l'immunité après vaccination
1	720	9	»	9	9	»	»
2	1.800	10 (1)	2 (2) présumés.	7	6	1 (3)	3 mois.

(1) Un lapin est resté bien portant pendant trois mois et demi et servit alors à d'autres expériences.

(2) Paralysie des membres postérieurs. L'inoculation de passage du cerveau ne donna pas la rage à d'autres lapins.

(3) Ce lapin au bout de deux mois et demi fut encore éprouvé une seconde fois. Il prit la rage après une incubation normale.

Ainsi dans les conditions de l'expérience décrite :

1° Les frictions de la peau avec du vaccin rabique vivant, mais atténué par la dessiccation (n° 1), n'ont déterminé ni rage expérimentale, ni immunité envers l'infection d'épreuve.

2° Les frictions de la peau avec du vaccin non atténué par dessiccation (n° 2) ont pu provoquer une maladie mortelle, présumée rage, accompagnée de paralysie des extrémités postérieures, et, quoique très rarement, elles ont conféré une résistance nette vis-à-vis de l'infection expérimentale sous-dure-mérienne réalisée une seule fois.

B. — IMMUNISATION PAR VOIE SOUS-DURE-MÉRIENNE.

Les vaccins utilisés furent les suivants :

N° 3 : Cerveau et moelle de lapin mort de rage, desséchés à 22°C pendant quatre jours;

N° 4 : Les mêmes desséchés pendant cinq jours;

N° 5 : Moelle desséchée pendant un jour;

N° 6 : La même desséchée, deux jours;

N° 7 : La même de trois jours;

N° 8 : La même de quatre jours;

N° 9 : La même de cinq jours;

N° 10 : Les inoculations successives des vaccins n° 7, 8 et 9;

N° 11 : Ce vaccin était préparé comme il suit : le cerveau de l'animal atteint de rage expérimentale et sacrifié fut émulsionné à l'aide de billes de verre dans l'eau physiologique en dilution à 1 p. 50. On y ajouta 1 p. 100 de *formol* et on laissa le tout à l'étuve à 37° pendant une heure. L'émulsion fut agitée à plusieurs reprises, puis centrifugée et décantée; le précipité fut lavé dans une nouvelle quantité d'eau physiologique, centrifugé de nouveau et mis en suspension dans de l'eau physiologique fraîche, dans la proportion de 1 p. 20. 1 cent. cube d'émulsion contenait en moyenne 50 milligrammes de substance cérébrale humide.

Ainsi dans les conditions de cette série d'expériences (voir tableau II) :

1° Quelques-uns des vaccins, aux doses utilisées, inoculés par voie sous-dure-mérienne, se sont montrés incapables de provoquer la rage expérimentale (n°s 3, 5, 6, 7, 8).

2° Les vaccins antirabiques vivants, affaiblis par dessiccation et incapables de provoquer la rage chez les lapins, n'ont conféré à ces animaux aucune immunité contre l'infection d'épreuve (n°s 4, 2, 10).

3° Le vaccin tué par le formol (n° 11), introduit sous la dure-mère à doses massives, fut également incapable de provoquer la rage, mais dans quelques cas au moins il conféra aux animaux une résistance manifeste contre l'infection grave, expérimentalement réalisée par voie sous-dure-mérienne ou même intracérébrale.

TABLEAU II. — Résultats de l'immunisation
par la voie sous-dure-mérienne.

Vaccination : par voie sous-dure-mérienne avec 0 c.c. 2-0 c.c. 3 (en dilution à 1 p. 250) des vaccins n°s 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 ou avec 0 c.c. 5-1 c.c. 5 (en dilution à 1 p. 20) des vaccins n°s 9 et 11. Les lapins vaccinés, restés vivants le septième jour après la première inoculation, furent revaccinés avec le même vaccin, à la même dose, le huitième jour. Les animaux survécurent sept jours après cette seconde inoculation; une partie d'entre eux reçut le même vaccin une troisième fois.

Infection d'épreuve : sous-dure-mérienne ou intracérébrale (voir préambule) deux, trois, cinq, neuf, douze semaines après la fin de la vaccination.

NUMÉROS des vaccins	QUANTITÉ de vaccin en milligrammes	LAPINS VACCINÉS	RAGE après vaccination	LAPINS VACCINÉS et infectés	RAGE après la première infection contrôle	IMMUNITÉ envers une première infection contrôle	DURÉE de l'immunité après vaccination
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	De 0,8 jusqu'à 75.	42	15 (1)	27 (2)	27 (2)	»	»
11	Depuis 25 jusqu'à 75.	5	»	5	3 (3)	2 (4)	Jusqu'à 4 mois.

(1) Inoculés avec les vaccins n°s 3, 5, 6, 8.

(2) Immunisés avec les vaccins n°s 4, 9, 10.

(3) Deux vaccinés une fois et un trois fois à intervalles d'une semaine.

(4) Vaccinés deux fois à intervalle d'une semaine et, quatre semaines après la dernière vaccination, éprouvés sous la dure-mère. Deux semaines après cette infection ils furent soumis à une seconde épreuve virulente (l'un par voie sous-dure-mérienne et l'autre dans le cerveau). L'animal, qui avait été éprouvé par l'injection intracérébrale, succomba à la rage après incubation normale; celui qui avait été éprouvé par injection sous-dure-mérienne survécut. Quatre mois après la fin de sa vaccination, ce lapin fut éprouvé une troisième fois par injection sous la dure-mère. Il survécut encore et continua à se bien porter.

C. — IMMUNISATION PAR VOIE MÉNINGÉE.

Avant d'employer cette méthode nous avons d'abord répété les expériences de Marie et Mutermilch. Le vaccin éthérisé (n° 12) (durée de l'éthérisation du cerveau jusqu'à six jours) fut

injecté une seule fois par voie méningée à deux lapins aux doses de 0 c. c. 5 (en moyenne 25 milligrammes de substance cérébrale) et deux fois à 5 lapins à intervalle d'une semaine

TABLEAU III. — Résultats de l'immunisation par voie méningée.

Vaccination : par voie méningée avec 0 c. c. 5 de vaccin n° 12 une, deux fois, ou avec 0 c. c. 5 de vaccin n° 11, une, deux ou trois fois à intervalles d'une semaine.

Infection d'épreuve : sous-dure-mérienne ou intracérébrale (voir préambule) au bout d'une et demie, trois, quatre, cinq semaines après la fin de la vaccination. Les lapins, qui la première fois avait été éprouvés par voie sous-dure-mérienne, le furent la seconde fois par voie intracérébrale et vice versa.

NUMÉROS des vaccinés	QUANTITÉ de vaccin en milligrammes	LAPINS VACCINÉS	RAGE après vaccination	LAPINS VACCINÉS et infectés	RAGE après la première infection contrôle	IMMUNITÉ envers une première infection contrôle	DURÉE de l'immunité après vaccination
12	25	2	2	»	»	»	»
12	50	5	5	»	»	»	»
11	25	9	»	9	4	5 (1)	De 4 à 6 mois et demi.
11	50	9	»	9	2	7 (2)	
11	75	12	»	12	1 (4)	11 (3)	

(1) Infectés quatre semaines après la vaccination; dix-neuf jours après la première infection, ils furent infectés une seconde fois. Deux animaux succombèrent à la rage et trois autres continuèrent à se bien porter. Un d'entre eux, quatre mois après la vaccination, fut soumis une troisième fois à l'épreuve sous-dure-mérienne. Il survécut et continue à se bien porter.

(2) Infectés trois ou quatre semaines après la seconde vaccination. Un d'entre eux, durant quatre mois, fut soumis une seconde et une troisième fois à l'épreuve. Il survécut et continue à se bien porter.

(3) Infectés trois ou quatre semaines après la troisième vaccination : dix par voie sous-dure-mérienne et un par voie intracérébrale. Neuf d'entre eux sont restés bien portants pendant quatre mois et les deux autres, au bout de ce temps, furent soumis une seconde fois à l'épreuve. Ils survécurent. Ces deux lapins, au bout de six mois et demi, après la troisième vaccination, furent soumis à une troisième épreuve par voie sous-dure-mérienne et intracérébrale (vice versa). Tous deux succombèrent à la rage après une incubation prolongée de six jours.

(4) *Lapin n° 128* infecté dans le cerveau quatre semaines après la troisième vaccination. Immédiatement avant l'injection du virus fixe, on prit à ce lapin, par voie méningée, le liquide céphalo-rachidien (0 c. c. 8). Ce liquide était virulicide.

(50 milligrammes de substance cérébrale). Tous ces animaux succombèrent à la rage, quoique avec incubation prolongée (douze, quatorze jours après la première inoculation). En prolongeant le temps de l'éthérisation du cerveau jusqu'à dix jours et en inoculant le vaccin sous la dure-mère en quantité deux

fois^o moindre, on put s'assurer de l'innocuité de celui-ci. Néanmoins, pour les expériences suivantes, on utilisa exclusivement le vaccin n° 11, tué par le formol.

Ainsi (tableau III) :

1° Le vaccin affaibli par l'éther, mais incomplètement tué (n° 12), inoculé par voie méningée, est capable de provoquer la rage expérimentale (incubation prolongée).

2° Le vaccin tué par le formol (n° 11), et incapable de provoquer la rage dans les mêmes conditions, confère aux lapins une immunité nettement manifeste contre l'infection grave expérimentalement réalisée par voie sous-dure-mérienne ou même intracérébrale (après une seule vaccination 5 lapins sur 9; après deux vaccinations 7 lapins sur 9 et après trois vaccinations 11 lapins sur 12, possédaient l'immunité contre la première inoculation virulente).

3° Il faut attirer l'attention sur deux faits : la privation du lapin vacciné (n° 128) de son liquide céphalo-rachidien virulicide au moment de l'inoculation virulente et l'absence de l'immunité contre l'infection intracérébrale de la rage chez le même lapin.

D. — IMMUNISATION PAR VOIE INTRACÉRÉBRALE.

On essaya d'injecter le vaccin formolé (n° 11) dans le cerveau des lapins, à la même dose (75 milligrammes de substance cérébrale) à *trois* ou à *deux* reprises à une semaine d'intervalle et même *une fois*. Beaucoup de lapins périrent immédiatement après l'inoculation du vaccin. Cependant, au total, 6 lapins survécurent à la vaccination intracérébrale et furent soumis à l'infection d'épreuve.

Le vaccin formolé (n° 11) [tableau IV], introduit directement dans le cerveau, est donc incapable de provoquer la rage, mais dans quelques cas il peut produire chez les lapins une résistance manifeste contre l'infection expérimentale sous-dure-mérienne ou intracérébrale.

TABLEAU IV. — Résultats de l'immunisation par voie intracérébrale.

Vaccination : par voie intracérébrale avec 1 c.c. 5 de vaccin n° 11 à deux ou trois reprises et même en une fois à une semaine d'intervalle.

Infection d'épreuve : intracérébrale ou sous-dure-mérienne (voir préambule) à une semaine d'intervalle trois ou quatre semaines après la fin de la vaccination.

NUMÉROS des vaccins	QUANTITÉ de vaccin en milligrammes	LAPINS VACCINÉS	RAGE après vaccination	LAPINS VACCINÉS et infectés	RAGE après la première infection contrôle	IMMUNITÉ envers une première infection contrôle	DURÉE de l'immunité après vaccination
11	1 fois par 75.	2	»	2	2	»	»
11	2 fois par 37,5.	2	»	2	2	»	»
11	3 fois par 25.	2	»	2	»	2 (1)	1 mois 1/3.

(1) Deux lapins, quatre semaines après la troisième vaccination, furent soumis à l'infection d'épreuve (un sous la dure-mère et l'autre dans le cerveau). Ils survécurent et continuèrent à se bien porter pendant dix-huit jours. Le dix-neuvième jour ils furent de nouveau soumis à l'infection d'épreuve (sous la dure-mère). Ils succombèrent trois jours après la seconde infection virulente avec des phénomènes méningés (convulsions et autres).

E. — IMMUNISATION INTRAMUSCULAIRE ET SOUS-CUTANÉE.

Ayant obtenu les résultats sus-décrits, il était nécessaire d'éprouver les propriétés immunisantes du vaccin n° 11 par les méthodes de vaccination habituelles.

TABLEAU V. — Résultats de l'immunisation par voies intramusculaire et sous-cutanée.

Vaccination : par voie intramusculaire ou sous-cutanée avec 1 cent. cube de vaccin n° 11, trois fois à intervalle d'une semaine.

Infection d'épreuve : sous-dure-mérienne ou intracérébrale (voir préambule trois semaines et demie après la fin de la vaccination).

NUMÉROS des vaccins	MÉTHODE de vaccination	QUANTITÉ de vaccin en milligrammes	LAPINS VACCINÉS	RAGE après vaccination	LAPINS VACCINÉS et infectés	RAGE après la première infection contrôle	IMMUNITÉ envers une première infection contrôle	DURÉE de l'immunité après vaccination
11	Intramusculaire.	450	2	»	2	»	2	4 mois, bien portant.
11	Sous-cutanée.	150	2	»	2	2	»	»

Ainsi :

1° Le vaccin formolé (n° 11) inoculé à doses massives par

voie intramusculaire est capable de provoquer chez les lapins une immunité manifeste contre l'infection rabique expérimentalement réalisée par voie sous-dure-mérienne ou même intracérébrale.

2° L'inoculation du vaccin n° 11 par voie sous cutanée, dans les mêmes conditions, ne produit aucune résistance chez les animaux de laboratoire contre la rage expérimentale.

3° Les effets de l'immunisation dans la rage expérimentale sont influencés non seulement par les propriétés du vaccin n° 11, mais aussi par la méthode d'inoculation du vaccin.

F. — Enfin, nous signalerons les faits suivants, observés dans quelques expériences isolées, effectuées au cours de ce travail :

1° Le virus fixe, inoculé aux lapins par voie méningée, provoque la rage après une incubation normale.

2° Le liquide céphalo-rachidien du lapin, inoculé au lapin par voie sous-dure-mérienne, le cinquième jour après l'infection avec le virus fixe, est capable de provoquer la rage après une incubation normale;

3° Le liquide céphalo-rachidien et le sérum des lapins immunisés par voie méningée manifestent des qualités virulicides.

4° Le cerveau des lapins vaccinés et infectés avec le virus fixe, deux mois après l'infection d'épreuve, ne contient pas de virus vivant.

5° Une seule inoculation par voie méningée de liquide céphalo-rachidien provenant de lapins vaccinés est incapable de provoquer chez les lapins une résistance contre l'infection d'épreuve.

Toutes les réactions de l'organisme contre les infections qui menacent le système nerveux central consistent à empêcher ce système de devenir un champ de lutte contre l'infection. Les méninges et les parois de la partie précapillaire des vaisseaux cérébraux afférents garantissent la défense du tissu nerveux contre la pénétration et l'influence des microbes pathogènes. Mais les anticorps du type d'antitoxine ne pénétrèrent point ou pénétrèrent très difficilement (Sicard, Stern) à travers cette barrière hémato-encéphalique (Stern). La même barrière peut

entraver le passage des substances défensives antirabiques (rabcides), que l'organisme a élaborées en dehors et qui peuvent appartenir aux globulines du sérum. Si l'on pouvait faciliter l'accès des substances rabcides au delà de la barrière, ou bien provoquer leur production dans la cavité méningée, peut-être la défense du système nerveux serait-elle considérablement facilitée. Voilà pourquoi la méthode d'application de l'antigène rabique acquiert une grande valeur objective.

L'injection dans la cavité méningée de petites doses d'antigène rabique vivant, affaibli, ne détermine pas de maladie, mais elle n'engendre pas l'immunité. L'inoculation par voie méningée de grandes doses de cet antigène peut provoquer la rage. Il s'ensuit qu'en employant la méthode de vaccination par voie méningée on doit donner la préférence à l'antigène rabique tué. L'emploi des méthodes de vaccination par voie méningée ou intracérébrale fait penser qu'il existe deux voies pour le mécanisme de la formation de l'immunité contre la rage :

1° L'apparition de l'immunité dans les cellules des parois de la cavité méningée et la production par les éléments mésodermiques de ces parois de substances défensives rabcides, qui pénètrent de la cavité méningée immédiatement dans le tissu cérébral et défendent le système nerveux contre le virus : les expériences sus-décrites nous montrent que les lapins vaccinés par voie méningée sont immunisés contre l'infection intracérébrale. La structure syncytiale des méninges (Rothstein, Thor, Avery) garantit la vitesse de la réaction biologique tout le long du tissu syncytial ;

2° D'autre part, il est possible que les cellules de l'épendyme, ainsi que celles de la névroglie, puissent aussi donner lieu à la formation de substances défensives : l'inoculation par voie intracérébrale de doses suffisantes d'un antigène rabique tué, complètement inoffensif, directement dans la substance cérébrale, a donné, chez les lapins de quelques-unes de nos expériences, une résistance manifeste contre l'infection d'épreuve intracérébrale.

Nos expériences ne nous permettent pas d'opposer les antigènes rabcides vivants aux antigènes tués. Mais elles nous portent à croire que si l'on injecte l'antigène rabique tout près

du système nerveux central il est plus rationnel d'utiliser l'antigène rabique tué.

Il est probable qu'indépendamment de l'espèce d'antigène rabique, inoculé par diverses voies, l'irritation immunisante est communiquée à l'organisme par la dose suffisante du complexe tué du virus. Le virus rabique a une grande affinité pour le tissu nerveux, qui est incapable de se défendre et de se régénérer. De ce fait, l'organisme est forcé de rendre ce virus complètement inoffensif en dehors des limites du système nerveux central.

En résumé, nous pouvons conclure de nos expériences que :

1° Les méthodes de vaccination contre la rage qui doivent être préférées sont celles qui augmentent la résistance de la barrière hémato-encéphalique, la production et la pénétration des substances défensives (rabcides) dans le système nerveux central, et, plus encore, celles qui provoquent la production de ces substances défensives dans la cavité méningée même;

2° L'immunité contre la rage peut être obtenue au moyen de vaccins vivants ou tués. Mais quand le lieu d'injection de l'antigène se trouve très près du système nerveux central (voies sous-dure-mérienne, méningée, intracérébrale), cet antigène doit être absolument inoffensif. Le vaccin n° 11, tué par le formol, répond à ces conditions.

BIBLIOGRAPHIE

1. DE GEORGE. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 1096-1097.
2. BIGLIERS-VILLEGAS. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 1176-1177.
3. MARIE et METERMILCH. *Ac. d. Sc.*, 1927.
4. REMLINGER. *Ces Annales*, 1928, p. 349 et 736.
5. SPERANSKY. *Ces Annales*, 1927 et 1928.
6. STERN. *Arch. internation. de physiol.*, 1922.
7. ROTHSTEIN, THOR, AVERY, RICHTER. *The Journ. of Inf. Dis.*, 1928, 43, n° 1.

LE RÉFLEXE CONDITIONNEL ET LES RÉACTIONS DE L'IMMUNITÉ

par OSTROVSKAYA (O. A.).

*(Institut Tarasséwitsch de Thérapie expérimentale
et de contrôle des sérums et vaccins;
Directeur : Professeur Diatrotsoff.)*

Nous nous sommes proposé de répéter les expériences de Métalnikoff sur le rôle du réflexe conditionnel dans l'immunité (1). Nous avons expérimenté sur des cobayes et des lapins selon la méthode employée par Métalnikoff. 43 cobayes ont reçu dans le péritoine, chaque jour pendant trois semaines, des injections d'antigène (bouillon) associées à une excitation externe quelconque. Chez 27 de ces cobayes on a pratiqué le chauffage d'une zone déterminée de la peau au moyen d'une plaque métallique portée à 50-57° et appliquée à plusieurs reprises pendant trois-cinq minutes. 7 cobayes furent soumis au grattage d'une même région et 9 à l'excitation électrique de l'oreille. On évaluait la formule leucocytaire de l'exsudat péritonéal avant l'injection de l'antigène et deux heures et demie et vingt-quatre heures après. Les animaux restaient au repos de dix à quinze jours après l'immunisation pour être ensuite remis en expérience et subir l'excitation conditionnelle seule, sans introduction de l'antigène. L'exsudat était examiné avant l'expérience et deux heures, cinq et vingt-quatre heures après. La présence chez les cobayes d'une formule leucocytaire semblable à celle observée après introduction du bouillon (augmentation des polynucléaires après deux-cinq heures

(1) Ces *Annales*, n° 11, 1926 et *C. R. de la Soc. de Biol.*, n° 20, 1928.

et des monocytes après vingt-quatre heures) était interprétée comme le début des manifestations du réflexe conditionnel. Sur 27 cobayes qui subirent l'excitation par chauffage à la plaque métallique, 21 montrèrent une réaction positive à l'excitation conditionnelle; 6 restèrent indifférents. Parmi les 7 qui reçurent l'excitation par grattage, 3 répondirent positivement et, sur le lot de 9 soumis à l'excitation électrique à l'oreille, 5 montrèrent une réaction de défense. Voici à titre d'exemple les résultats de quelques-unes de nos expériences (I, II, III, IV).

EXPÉRIENCE I. — Formule leucocytaire de l'exsudat péritonéal chez les cobayes après injection de bouillon.

CELLULES DE L'EXSUDAT	AVANT l'expérience	2 HEURES après	5 HEURES après	24 HEURES après
Lymphocytes p. 100	72	8	4	20
Monocytes p. 100	26	7	»	38
Polynucléaires p. 100	2	85	96	42
Quantité totale des cellules . .	++	++++	++++	+++

EXPÉRIENCE II. — Formule leucocytaire de l'exsudat péritonéal chez le cobaye n° 4; réaction à une excitation conditionnelle (chauffage à la plaque métallique).

CELLULES DE L'EXSUDAT	AVANT l'expérience	2 HEURES après	5 HEURES après	24 HEURES après
Lymphocytes p. 100	84	11	5	13
Monocytes p. 100	5	3	25	57
Polynucléaires p. 100	11	86	70	30
Quantité totale de cellules . .	++	++++	+++	++

EXPÉRIENCE III. — Formule leucocytaire de l'exsudat péritonéal chez le cobaye n° 5; réaction à une excitation conditionnelle (grattage).

CELLULES DE L'EXSUDAT	AVANT l'expérience	2 HEURES après	5 HEURES après	24 HEURES après
Lymphocytes p. 100	37	12	7	43
Monocytes p. 100	56	16	46	51
Polynucléaires p. 100	7	72	47	10
Quantité totale de cellules . .	++	++++	+++	++

EXPÉRIENCE IV. — Formule leucocytaire de l'exsudat péritonéal chez le cobaye n° 6; réaction à une excitation conditionnelle (excitation électrique de l'oreille).

CELLULES DE L'EXSUDAT	AVANT l'expérience	2 HEURES après	5 HEURES après	24 HEURES après
Lymphocytes p. 100	47	16	2	43
Monocytes p. 100	44	72	2	38
Polynucléaires p. 100	9	42	96	49
Quantité totale de cellules . .	++	+++	++++	++

Ces expériences sembleraient indiquer que, chez la majorité des cobayes, le réflexe conditionnel s'établit après des injections répétées de l'antigène accompagnées de l'une ou l'autre excitation conditionnelle. Pour savoir jusqu'où les excitants externes employés par nous sont indifférents aux cobayes et ne sauraient par eux-mêmes provoquer une réaction semblable à celle qui répond aux excitations conditionnelles, nous avons effectué des expériences de contrôle. Nous avons éprouvé nos excitants externes sur des animaux neufs non immunisés, et sur d'autres immunisés, mais non soumis à l'excitation conditionnelle. Sur 36 cobayes neufs, 8 montrèrent une réaction des leucocytes de l'exsudat péritonéal aux excitations; 7 au chauffage de la peau du ventre par la plaque métallique (53-57°) et 1 à l'excitation électrique de l'oreille. Parmi les 8 cobayes qui reçurent 15 injections intrapéritonéales de bouillon, non associées à des excitations conditionnelles externes, 2 accusèrent une réaction des leucocytes au chauffage (expériences V et VI).

EXPÉRIENCE V. — Formule leucocytaire de l'exsudat péritonéal du cobaye neuf témoin n° 11; réaction au chauffage à la plaque métallique.

CELLULES DE L'EXSUDAT	AVANT l'expérience	2 HEURES après	5 HEURES après	24 HEURES après
Lymphocytes p. 100	35	40	11,5	36
Monocytes p. 100	51	19	33,5	46,5
Polyucléaires p. 100	14	41	55	17,5
Quantité totale de cellules . .	++	+++	+++	++

EXPÉRIENCE VI. — **Formule leucocytaire de l'exsudat péritonéal du cobaye témoin n° 7 immunisé; réaction au chauffage à la plaque métallique.**

CELLULES DE L'EXSUDAT	AVANT l'expérience	2 HEURES après	5 HEURES après	24 HEURES après
Lymphocytes p. 100	48	5	1	8
Monocytes p. 100	38	35	72	82
Polynucléaires p. 100	14	60	27	10
Quantité totale de cellules . .	++	+++	+++	++

Les expériences de contrôle indiquent que le chauffage n'est pas un excitant indifférent. L'excitation électrique ne l'est pas non plus complètement; mais le grattage s'est montré parfaitement indifférent et ce sont les expériences avec cet excitant qui viennent nous confirmer dans l'idée que le réflexe conditionnel joue un rôle dans les réactions cellulaires de l'immunité. Ce qui vient appuyer cette manière de voir c'est la confrontation du nombre des animaux ayant montré une réaction de défense parmi les sujets en expérience et celui des témoins : cependant que sur 43 cobayes en expérience la réaction a été positive chez 29, autrement dit dans 67 p. 100 des cas, elle ne l'a été que 10 fois sur les 44 témoins, c'est-à-dire dans 22 p. 100 des cas. Pour préciser le rôle du réflexe conditionnel dans la formation des anticorps dans le sang, nous avons immunisé 12 lapins avec un vaccin typhique (germes tués) injecté pendant trois semaines tous les jours dans la veine de l'oreille. Chaque injection de vaccin était associée à une excitation conditionnelle externe. Chez 10 lapins, l'excitation conditionnelle a été exécutée à l'aide d'une sonnerie électrique avec interruption de deux-trois minutes, et chez 2 lapins on a fait agir sur la peau une plaque métallique chauffée. Dès que les injections étaient terminées on évaluait le titre de l'agglutination du sérum, et seulement à partir du moment où le titre baissait on pratiquait l'excitation conditionnelle sans introduction de l'antigène (vaccin). Sur les 12 lapins immunisés, 11 montrèrent une élévation du titre agglutinant à l'excitation conditionnelle externe sans injection d'antigène (Tableau I).

TABLEAU I. — Changement du titre de l'agglutination chez les lapins en expérience nos 137, 79 et 35, exposés aux excitations conditionnelles externes.

NUMÉROS	AVANT l'expérience	5 HEURES après	1 JOUR après	2 JOURS après	3 JOURS après	4 JOURS après
137 . . .	1/2.000	1/8.000	1/5.000	1/5.000	1/5.000	1/3.000
79 . . .	1/5.000	1/5.000	1/10.000	1/12.000	1/12.000	1/8.000
35 . . .	1/2.000	1/2.000	1/3.000	1/5.000	1/3.000	»

Pour préciser le rôle des excitants, nous nous sommes servis, comme sujets de contrôle, de lapins qui avaient été immunisés avec des vaccins typhiques et cholériques dans des expériences antérieures, mais sans avoir été soumis aux excitations conditionnelles. Les excitants appliqués furent les mêmes. Sur 11 lapins, 9 accusèrent, à l'excitation externe sans introduction d'antigène, une élévation du titre de l'agglutination du sérum (Tableau I).

TABLEAU II. — Changement du titre de l'agglutination chez les lapins témoins n° 20 et n° 113 exposés à une excitation.

NUMÉROS	AVANT l'expérience	5 HEURES après	1 JOUR après	2 JOURS après	3 JOURS après	4 JOURS après
20 . . .	1/3.000	1/5.000	1/5.000	1/3.000	»	»
113 . . .	1/1.000	1/1.000	1/3.000	1/1.000	»	»

Ces expériences montrent que le titre de l'agglutination s'élève en réponse aux excitations conditionnelles chez les animaux en expérience, tout aussi bien que chez les témoins exposés à l'excitant seul. L'excitation conditionnelle détermine cependant une élévation du titre plus stable que celle qui correspond à l'excitant seul.

Nos recherches nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

1° Chez les cobayes ayant reçu des injections intrapéritonéales répétées d'antigène, associées à des excitations externes, le réflexe conditionnel établi pendant l'immunisation provoque

une réaction cellulaire du péritoine semblable à celle observée à la suite de l'injection de l'antigène.

2° Nos expériences sur les lapins n'ont pas fait ressortir de façon nette le rôle du réflexe conditionnel dans la formation des agglutinines : l'élévation du titre de l'agglutination a été observée, comme sous l'influence de l'excitation conditionnelle, sous l'influence de l'excitant seul, toutefois dans les premières de ces conditions elle se manifestait de façon plus stable.

LES TROUBLES « TROPHIQUES » LIMITÉS ET DIFFUS

par le Dr A. D. SPERANSKY.

I

Dans un mémoire précédent (1), j'ai cité une partie de nos expériences relatives à la production de lésions symétriques, en particulier celles du Dr A. S. Wichnewsky sur les ulcères « trophiques » des extrémités postérieures et celles du Dr P. W. Manienkow sur le développement des lésions symétriques des yeux. Toutes ces expériences ont été exécutées sur des chiens. Wichnewsky déposait dans le tronçon central du nerf sciatique sectionné d'un chien une petite quantité de produit muco-purulent extrait d'un foyer chronique chez l'homme. Il procédait ensuite à l'évacuation périodique du liquide céphalo-rachidien et il obtenait rapidement des lésions « trophiques » symétriques des extrémités postérieures, présentant le caractère d'ulcères profonds et même de gangrène. Dans la suite, il introduisit dans le nerf d'autres substances irritantes, notamment de la bile et de l'huile de croton faiblement concentrée, et il procéda périodiquement à l'évacuation du liquide céphalo-rachidien. Il réussit ainsi à accélérer beaucoup l'évolution des lésions mentionnées. Dans quelques cas, il se développait un ulcère trophique du côté de la lésion nerveuse dès le troisième jour après l'opération et, vers le septième ou le neuvième jour, au point symétrique de l'autre pied.

Il est encore impossible d'analyser ce processus et de l'exposer avec clarté, en raison de l'insuffisance de données précises sur les rapports entre les systèmes nerveux central et sympathique et des idées actuelles sur leur rôle réciproque dans l'action « trophique » périphérique. En étudiant les lésions segmentaires de la région cérébro-médullaire, nous chercherons

(1) *Ces Annales*, 43, 1929.

à préciser comment se produit la lésion du système nerveux, c'est-à-dire l'aspect extérieur du processus ou son mécanisme. Telle ou telle substance, ayant atteint la région cérébro-médullaire, peut provoquer au début un trouble direct des cellules nerveuses correspondantes. Puis le processus se développera de deux manières différentes. Dans certains cas, l'excitation se propage de soi-même dans le système cérébro-médullaire. Ceci a lieu au cours de la rage, et dans l'intoxication par les toxines microbiennes véritables qui provoquent un effet considérable même dans les cas où leur quantité dans le système nerveux est minime (tétanos). Dans d'autres cas, la marche du processus est différente.

Dans les expériences de Wichnewsky, le processus ulcéreux et la gangrène avaient pour siège les tissus qui, au début même de l'expérience, au cours de la section du nerf sciatique, étaient séparés du système nerveux central. Donc, une action directe de la cellule nerveuse centrale atteinte sur les tissus périphériques ne peut être admise dans ce cas. Au cours des expériences citées, ainsi que dans maintes autres ci-dessous mentionnées, nous avons observé que l'action de tel ou tel excitant, ayant pénétré dans le tronc nerveux, ne se manifestait souvent dans les tissus périphériques que fort tard. Ainsi, nous avons noté l'apparition d'ulcères « trophiques » symétriques du pied indemne chez le chien, dans quelques cas le septième jour après le début de l'expérience, dans d'autres après deux mois. Il est certain que dans cet intervalle l'excitant, utilisé à plusieurs reprises, ne laisse aucune trace dans l'organisme. Nous observons ici presque le même phénomène que j'ai eu déjà l'occasion de noter en exposant les résultats de la congélation partielle de l'écorce cérébrale des chiens. L'action de l'excitant dirigée sur une cellule nerveuse, ayant atteint une certaine intensité, ne peut être arrêtée dans la suite, même lorsqu'on supprime l'excitant. La cellule nerveuse atteinte peut déterminer l'altération d'une autre cellule nerveuse indemne non seulement grâce à l'action de l'excitant, mais aussi en raison de son influence « nerveuse » sur cette dernière. Non seulement les cellules centrales des deux moitiés du segment sont entraînées dans le processus, mais aussi les cellules sympathiques liées aux premières. Il se produit une lésion du segment

nerveux entier dans le sens large du mot. Ce processus s'effectue tantôt plus rapidement, tantôt plus lentement selon des conditions encore mal connues. Wichniewsky a constaté, au cours de ses études microscopiques sur le système cérébro-médullaire de malades ayant succombé à la gangrène spontanée, différents degrés d'altération des cellules des cornes latérales et parfois une perte complète des éléments nerveux. Charapow a récemment exposé dans une séance de la Société des Neurologistes, à Léninegrad (1929), les résultats d'une analyse microscopique du système nerveux d'un patient souffrant de gangrène spontanée de l'extrémité supérieure. Il a constaté des altérations très graves, aboutissant à une perte complète des cellules nerveuses, dans un des ganglions sympathiques du cou. Donc, il serait également erroné de considérer tous les symptômes périphériques comme dépendant uniquement des troubles du système nerveux central, ou de les lier uniquement aux modifications des ganglions sympathiques. Le point de départ de cette question même est radicalement faux, car les cellules et les voies sympathiques se trouvent aussi à l'intérieur du système nerveux. Si l'on réussit actuellement à obtenir un effet distinct de l'irritation de la cellule nerveuse centrale ou sympathique, cela ne se produit que dans les expériences de courte durée, et dans les cas où l'effet accompagne directement ou se manifeste peu après l'irritation. Par contre, il serait tout à fait impossible d'admettre un rôle distinct des deux systèmes au cours d'une expérience de longue durée, où les suites de l'irritation sont retardées fréquemment de plusieurs jours et même de plusieurs semaines. C'est pour cette raison que les expériences relatives à l'extirpation de portions du tronc sympathique et des ganglions sympathiques séparés, ainsi que de portions du système nerveux central, par exemple des ganglions intravertébraux, ne peuvent avoir qu'une portée relative. Dans la suite, un symptôme « pathologique » quelconque à la périphérie peut disparaître ou apparaître. Dans les deux cas, l'origine de ces modifications peut être due non aux parties éloignées mêmes, mais au fait de leur élimination, la chaîne des conditions du phénomène donné se trouvant rompue. Actuellement, le problème ne peut être envisagé que dans le sens de l'étude de l'aspect extérieur de ce processus.

Les expériences de P. W. Manienkow étaient exécutées dans des conditions non exemptes d'objections. Ce n'étaient que des expériences d'orientation. Pour qu'elles fussent démonstratives, il eût été indispensable de les perfectionner méthodiquement et avant tout de les exécuter selon une méthode simplifiée. Il eût fallu obtenir le résultat sans troubler l'intégrité des tissus de l'œil même. Ces expériences exécutées par nous (expériences des D^{rs} I. A. Pigalew et Z. G. Kousnetzow) nous conduisirent loin des limites de notre problème particulier. En procédant aux expériences nous nous fondions sur le fait que le processus entier observé par nous se développait consécutivement à la pénétration des substances toxiques du foyer local le long du tronc nerveux jusqu'à la cellule nerveuse. Cette dernière étant lésée ou atteinte (d'une manière ou d'une autre), il en résultait une modification ou une « déviation » du fonctionnement de la cellule nerveuse trophique. Il s'ensuit que, même en l'absence d'un foyer local ou en présence de celui-ci à un tout autre endroit, on peut obtenir le même résultat en faisant participer au processus la cellule nerveuse « trophique » de l'organe correspondant. Une série considérable de recherches anciennes et récentes permet de supposer que les troubles « trophiques » des yeux dépendent de modifications quelconques du nerf trijumeau. Telles sont les expériences bien connues de la section intracranienne et de l'irritation des branches du nerf trijumeau et du ganglion de Gasser, commencées par Magendie et poursuivies par Samuel, Meisner, Schiff, Kirchner et d'autres. Tous ces auteurs ont montré qu'à la suite de l'irritation ou de la lésion des cellules du ganglion de Gasser il se développe chez le lapin, sur le côté atteint, une conjonctivite, une kératite et même des ulcères perforants de la cornée. Ces expériences ont donné lieu à de nombreuses discussions quant à leur interprétation. On admettait, en effet, que l'affection de l'œil ne résulte que de la perte de sa sensibilité occasionnée par la lésion de la première branche du nerf trijumeau. Pour le démontrer, on citait des expériences témoignant de la possibilité de prévenir l'affection de l'œil chez le lapin opéré de la sorte, en le défendant contre les influences externes. Meisner et Schiff ont prouvé que ce point de vue n'est pas exact. En produisant des lésions partielles du ganglion de Gasser, ils conservaient la sensibilité de

l'œil du lapin et obtenaient néanmoins successivement de la kératite et des ulcères à la cornée. Dans la suite, Berthold (1) a montré qu'au cours de l'irritation du ganglion de Gasser on peut, en outre, observer chez le lapin de l'hyperémie et une exsudation dans la cavité de l'oreille moyenne. Nassé a constaté des conjonctivites lors de l'irritation du nerf mental.

Nous nous sommes proposé d'obtenir telles ou telles modifications de l'œil chez l'animal non seulement du côté du nerf lésé, mais aussi du côté opposé indemne. Nous avons cherché à produire ces modifications sur les troncs périphériques des branches du nerf trijumeau n'ayant pas de connexion directe avec l'œil, c'est-à-dire sur les nerfs de la seconde et de la troisième branche du nerf trijumeau. Pour provoquer une lésion de la cellule nerveuse, nous avons fait agir directement l'irritant chimique sur le tronc nerveux. On pouvait espérer que dans le ganglion de Gasser — point de rencontre des trois branches du nerf — surviendraient des modifications sinon régulières, du moins diffuses, indépendamment du nerf par l'intermédiaire duquel l'excitant était amené vers les cellules du ganglion. Nous avons essayé toute une série de substances, telles que l'huile de moutarde, l'huile de croton, la bile, l'acide lactique, etc. Nous nous sommes arrêté finalement à l'huile de croton, qui se montre particulièrement efficace. En l'employant, on doit chercher plutôt à affaiblir son action qu'à la renforcer. Cette huile a été déjà utilisée par Samuel en vue d'irriter les racines sensibles, et par Jaquet dans le dessein de provoquer des ulcères « trophiques » des extrémités postérieures du chien. Elle doit être introduite dans le nerf avec prudence, de préférence sous la forme d'une émulsion liquide (2). L'huile de croton pure étant introduite dans le nerf du chien ou du lapin à la dose de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 2 et le liquide céphalo-rachidien étant ensuite évacué, presque tous les animaux succombent durant les premières vingt-quatre heures ou un peu plus tard. Après avoir introduit cette faible quantité d'huile de croton, nous procédions à la section médiane du nerf au niveau de la partie

(1) Cité d'après *Samuel*.

(2) Une goutte d'huile se dissout dans 2 cent. cubes d'alcool pur, après quoi on ajoute 10 à 15 cent. cubes d'eau. On obtient de la sorte un liquide opalin. Nous introduisions cette émulsion dans le nerf du lapin à doses de 0,1-0,2.

gonflée lors de l'injection. Il en résultait un double avantage. D'abord l'excédent d'huile s'écoulait immédiatement du nerf et pouvait être éliminé; ensuite, au cours de la section du nerf — ainsi que l'ont décelé les expériences de Wichnewsky concernant les ulcères trophiques et celles de Gannet et Ponomarew sur le virus rabique — l'excitant entre en contact plus intime avec tous les éléments du tronc nerveux. Enfin, de petites quantités de substance produisent un grand effet dans la région sectionnée.

Pour exécuter nos expériences, nous avons choisi sur la deuxième branche du nerf trijumeau le nerf infraorbital, sur la troisième branche, le nerf mental. Il est impossible de prendre le tronc principal de la troisième branche parce que l'huile de croton détermine constamment une suppuration dans la région injectée. Le tronc principal de la troisième branche étant logé profondément, il se développe à la suite de l'injection des phlegmons profonds du cou, et les animaux succombent invariablement. Pour cette raison, nous ne suturons pas la plaie opératoire découvrant le nerf infraorbital ou le nerf mental. Nous pratiquons de petites incisions au-dessus du point d'émergence des nerfs de l'os, nous isolons le nerf sur une courte étendue, nous y injectons l'huile de croton et nous le sectionnons. La plaie étant suturée, il se développe bientôt un œdème, puis une suppuration abondante. Si la plaie reste ouverte, il ne se forme qu'un œdème qui disparaît en peu de temps. Chez les animaux soumis à l'évacuation du liquide céphalo-rachidien après l'injection intraveineuse d'huile de croton, l'œdème est toujours plus important, et ceci non seulement du côté opéré, mais aussi à l'endroit correspondant du côté opposé. Ce phénomène a été observé surtout chez les chiens.

Nos expériences ont été exécutées sur des lapins et sur des chiens. Dans tous les cas, nous n'introduisons les matières irritantes dans le nerf qu'une seule fois. Les détails de la méthode variaient de telle sorte que les expériences forment plusieurs séries. Les résultats obtenus ne différant que quantitativement, je me permettrai d'en donner un aperçu global. Il faut noter tout d'abord qu'après avoir introduit dans le nerf telle ou telle substance, et après l'avoir sectionné, nous ne procé-

dions à l'évacuation du liquide céphalo-rachidien que chez une partie des animaux. Avec l'huile de croton, on obtient souvent des troubles trophiques diffus, même en l'absence de toute évacuation du liquide céphalo-rachidien. Cependant, l'intensité et la rapidité de leur développement s'accroissent lorsqu'on effectue cette évacuation.

Les expériences exécutées sur les lapins en introduisant de l'émulsion d'huile de croton dans le nerf infraorbital indemne déterminèrent l'apparition, dès les premiers jours, de la photophobie et d'une conjonctivite du côté opéré. La conjonctivite ne devint bilatérale que dans un petit nombre de cas. En outre, au bout de deux ou trois jours, apparaissait à la lèvre supérieure du lapin, près de la ligne médiane, au point où l'épiderme se joint à la muqueuse, une tache bleuâtre suivie d'un ulcère; ce dernier s'étendait lentement et se cicatrisait en deux à trois semaines. Ayant introduit une « goutte » d'huile de croton pur dans le nerf infraorbital, puis ayant sectionné ce nerf, nous avons obtenu un résultat différent. La conjonctivite chez les lapins ainsi traités était généralement bilatérale. Dans un grand nombre de cas, on observe de la kératite et des ulcères de la cornée. Dans 4 cas (sur 8) nous avons obtenu de l'herpès de la cornée. Dans les vingt-quatre premières heures après l'opération, il apparaît, dans la région mentionnée de la lèvre supérieure, un ulcère qui s'agrandit rapidement et ne se cicatrise pas dans l'espace de cinq à six semaines. Deux à cinq jours après, un ulcère identique se développe dans la région correspondante de l'autre lèvre. Bientôt surviennent des ulcères symétriques de la langue. Dans 2 cas, nous avons constaté une inflammation bilatérale purulente de l'oreille moyenne, aux suites de laquelle les animaux ont succombé. Chez la plupart des animaux, tous ces accidents s'atténuaient peu à peu, ce qui, pourtant, ne signifie pas une guérison complète des lésions de la cellule nerveuse. Dans plus de la moitié des cas, six à huit semaines après l'intervention, il s'est produit, chez les lapins qui paraissaient indemnes, une altération des dents, en particulier des incisives, d'abord du côté de la lésion, ensuite du côté opposé. Le processus débute par l'apparition d'ilots blanchâtres qui s'agrandissent successivement, se confondent et envahissent la dent entière. Celle-ci devient poreuse, fragile, et

s'émiette. Ces altérations dentaires commencent plus tôt et sont plus accentuées du côté de la lésion que du côté « indemne ». Mais elles sont transitoires, car les incisives du lapin croissent sans interruption durant toute la vie. La partie en voie d'accroissement apparaît indemne, mais non d'une manière constante. Nous conservons depuis cinq mois deux lapins dont les incisives continuent à se détériorer facilement. Nous avons observé des faits analogues en opérant sur le nerf mental du lapin ; toutefois, les modifications des yeux survenaient un peu plus tard, les ulcères trophiques se développaient à la lèvre supérieure et les altérations des dents intéressaient les incisives inférieures. Dans un cas, outre les modifications des incisives inférieures, des îlots blanchâtres de carie apparurent, après quelques semaines, à l'incisive supérieure, du côté de la lésion nerveuse. On observa également des ulcères symétriques de la langue. Deux animaux de cette série ont présenté une inflammation bilatérale purulente de l'oreille moyenne, aux suites de laquelle ils succombèrent.

Dans les mêmes conditions, en dehors de plusieurs cas de kératite symétrique et d'ulcères perforants de la cornée des deux yeux, nous avons observé chez des chiens une série de processus symétriques ulcéreux au palais, à la langue, à la muqueuse buccale et aux lèvres. A plusieurs reprises, nous avons obtenu une inflammation bilatérale purulente de l'oreille moyenne et des cavités nasales supplémentaires. Ces accidents apparaissaient au cours de la lésion du nerf infraorbital ou du nerf mental.

J'insiste sur ce fait qu'en employant la méthode ci-dessus nous avons souvent constaté des troubles « trophiques », souvent graves, non seulement dans la région de la branche nerveuse choisie pour l'expérience, mais aussi dans le segment nerveux. Après la publication du travail de A. S. Wiechnewsky et P. W. Manienkov sur le développement des troubles « trophiques » symétriques, Kensaku Shiraishi, en traumatisant grossièrement le ganglion ciliaire d'un côté, a obtenu chez le chien une kératite bilatérale progressive et des ulcères perforants de la cornée. Une simple extirpation de ce ganglion n'était généralement pas suivie du développement de ces accidents.

Il s'agit donc d'un processus très compliqué, intéressant non seulement des parties du système nerveux central, mais aussi des cellules des ganglions sympathiques. Dans ce dernier cas, le processus ne dépend plus de la rencontre directe des cellules avec l'excitant. Il est possible que la modification ganglionnaire présente également un effet « trophique » de la lésion fonctionnelle des cellules nerveuses dans d'autres régions.

Quoi qu'il en soit, nos expériences montrent qu'un foyer local dans un nerf, dont la fonction est une innervation sensitive de la lèvre inférieure ou supérieure, est capable de provoquer des altérations graves des yeux, des cavités de l'oreille moyenne et d'autres troubles plus ou moins marqués.

Je pense que ces faits confirment l'existence d'une fonction trophique particulière, inhérente à la cellule nerveuse centrale et sympathique et que les phénomènes décrits ne peuvent être expliqués uniquement par le « jeu des vasomoteurs ». Toute autre interprétation des faits observés apparaît comme étant plus artificielle.

Les expériences ci-dessus mentionnées nous ramènent à la question de la « sensibilisation ». Dans une série de cas, nous avons obtenu, dans les tissus périphériques éloignés, en agissant sur la cellule nerveuse par tel ou tel tronc nerveux, le développement d'une inflammation purulente sans introduire l'agent infectieux dans les tissus. Les microbes saprophytes acquièrent ainsi des propriétés pathogènes. Le tissu devient plus susceptible, il se « sensibilise » vis-à-vis de ces germes. Ce phénomène se présente comme l'inverse de celui que nous avons observé au cours des expériences de A. W. Ponomarew sur les conditions de l'immunité locale. Là, au contraire, les microbes pathogènes se transformaient en microbes non pathogènes, tandis que le mécanisme des processus restait identique.

L'affinité des phénomènes de l'immunité locale et de la prédisposition locale exagérée a été mise en évidence par l'observation récente de N. G. Kotow et B. N. Kotliarienko. En étudiant la genèse des « réactions cutanées » (voir ci-dessus), ces auteurs ont constaté le fait suivant : un enfant, soumis trois semaines auparavant à la réaction de Dick sur l'épiderme d'un des avant-bras, contracte la scarlatine. Au début de la

maladie, l'éruption scarlatineuse couvrait régulièrement toute la surface du corps à l'exception d'une zone voisine du point de l'injection de la toxine. Cette zone formait une tache livide sur le fond de l'éruption. Simultanément une éruption particulièrement intense, en forme d'îlot limité ou de tache rouge, survint dans la région symétrique de l'autre avant-bras. Le même phénomène réapparut, à des degrés divers, dans la suite. Ce cas ne peut être interprété que de la manière suivante : on peut observer simultanément chez un individu, dans la région du même segment nerveux, mais en des points différents, l'immunité et une prédisposition exagérée de l'épiderme à la toxine scarlatineuse. Ces deux processus se développent sous la seule action de l'antigène injecté en un point de la surface cutanée. Je ne crois pas que leur « caractère nerveux » exige encore d'autres preuves. Il indique que deux processus, différents quant à leurs suites, survenant simultanément dans un segment nerveux sous l'influence des mêmes conditions, sont identiques dans leur nature.

Le processus destructif s'étant développé, ne fût-ce que dans un groupe de cellules, ne reste pas localisé. Débutant dans un groupe de cellules du foie, il peut provoquer la perte des cellules voisines. En dehors d'une propagation du processus *per continuitatem*, il existe dans le système nerveux d'autres conditions, un autre mécanisme, lié aux particularités fonctionnelles de ce système excessivement compliqué.

En observant nos chiens, dont la survie, après les expériences ci-dessus mentionnées, fut relativement longue, nous avons noté ce qui suit. Dans un nombre insignifiant de cas, les troubles trophiques ne se développaient pas. Dans d'autres cas, tous les troubles trophiques, même graves, de la région du segment du nerf trijumeau disparaissaient sans laisser d'autres traces que des cicatrices. Enfin chez une partie des chiens en parfaite santé, des altérations trophiques réapparurent dans les régions atteintes. On observa ensuite des îlots de calvitie et des ulcères en diverses régions, complètement étrangères au segment du nerf trijumeau. L'huile de croton étant introduite une seule fois dans une des branches de ce nerf, aucune autre opération n'était effectuée sur le tissu nerveux. On cessait également d'évacuer le liquide céphalo-rachidien bien avant

l'apparition des symptômes de généralisation des phénomènes dystrophiques. Cependant, aussitôt après le développement des ulcères symétriques, on constatait chez les chiens un amaigrissement, une modification de la démarche, et un dépérissement général qui aboutissait à la mort.

A l'autopsie, on trouvait des altérations des os, qui devenaient tantôt très minces et fragiles, tantôt au contraire mous à tel point que les côtes pouvaient être sectionnées avec un couteau. Le tableau de la maladie et les constatations nécropsiques sont très analogues à ceux que le professeur I. P. Pawlow a observés chez les chiens porteurs de fistules chroniques dans différentes parties du tube digestif et placés dans des endroits froids et humides.

Ainsi, dans des conditions expérimentales identiques, les suites tardives de l'expérience chez divers animaux de la même espèce sont différentes. Il existe par conséquent une « diathèse » individuelle propre aux troubles dystrophiques. Les causes de celle-ci résident dans la faculté plus ou moins accusée de la cellule nerveuse à être atteinte par l'excitant périphérique.

Il convient d'ajouter que les chiens considérés par nous comme complètement rétablis de la première expérience se montrèrent ensuite dans la plupart des cas incapables de supporter de nouvelles expériences : ils devenaient trop instables et succombaient sous des influences que d'autres animaux réellement normaux supportent aisément. En outre, on observe parfois chez ces animaux une récurrence véritable des troubles « trophiques » sous la forme d'ulcères ou d'autres altérations inflammatoires à l'endroit des lésions anciennes, par exemple sur la muqueuse de la cavité buccale. Ce phénomène pourrait parfaitement être rangé dans l'ordre des infections dites « latentes » ; cependant il est aisé de s'apercevoir qu'il ne s'agit ici que d'une apparence.

II

Le fait de la propagation des troubles « trophiques » en dehors des limites du segment atteint primairement, la généralisation successive et la symétrie de ce processus, ramènent involontairement la pensée à l'idée d'un processus morbide

fort répandu, mais dont la nature reste jusqu'à présent obscure. Il s'agit du rhumatisme, maladie infectieuse, mais, à ce qu'il paraît, non contagieuse. Elle peut être rangée plus aisément que toute autre dans le cadre des affections « catarrhales », et on emploie souvent à son propos l'expression de « diathèse ». Notons qu'il existe également dans cette maladie un facteur « prédisposant » si constant qu'il a donné lieu à l'établissement d'une forme particulière de constitution arthropatique. Le rhumatisme devient facilement chronique et détermine de graves modifications dans le système cardio-vasculaire.

Trouver l'excitant responsable de l'affection ! On le cherche partout : dans le sang, dans les excréments des cavités nasales et des voies respiratoires supérieures et sans doute dans les endroits les plus atteints, dans les articulations, dans le muscle cardiaque, dans les excroissances verruqueuses des valvules du cœur. Les recherches les plus minutieuses n'aboutissent à rien, sauf parfois à la découverte d'un streptocoque. Divers auteurs incriminent un virus invisible, auquel le streptocoque ne ferait que s'adjoindre. Cette dernière conjecture n'est basée que sur ce fait que le rhumatisme est une maladie infectieuse, qui se manifeste par une série de processus locaux graves à caractère inflammatoire, alors que l'excitant visible dans les tissus fait défaut.

Les recherches commencées par Aschoff en 1904, et poursuivies par une série d'autres expérimentateurs (en Russie, W. T. Talalaïew), autorisent à admettre un substratum anatomopathologique spécial du rhumatisme aigu. Les modifications observées lors de ce processus consistent dans l'apparition de foyers d'œdème miliaire dispersés, accompagnés du développement de menus granulomes, principalement dans le muscle cardiaque.

Nous avons montré que la présence de différentes modifications souvent graves, dans les tissus périphériques, ne témoigne pas nécessairement que ces tissus sont entrés en contact avec l'agent nocif.

Nous savons déjà que même dans les cas de troubles diffus et prolongés périphériques il suffit souvent que l'excitant pénètre dans le système nerveux, ne fût-ce qu'une seule fois et par un seul tronc nerveux.

La constatation d'un streptocoque dans les tissus atteints (exsudats articulaires) ou dans le sang ne prouve également rien. Nous avons observé quotidiennement, au cours de nos expériences, la transformation de microbes saprophytes en microbes pathogènes dans les tissus dont l'état « trophique » avait subi une altération d'origine centrale. Il nous importe beaucoup plus que les modifications anatomo-pathologiques des tissus, par exemple du muscle cardiaque ou des valvules, apparaissent comme absolument identiques lorsque le streptocoque est présent dans le cœur, ou lorsqu'il fait défaut. Enfin, nous accordons une attention particulière à ce fait que les affections rhumatismales des articulations offrent dans la plupart des cas un caractère symétrique.

Telle était la question soumise à nos recherches. Pour essayer de la résoudre on pouvait suivre deux voies : celle de l'expérience du laboratoire et celle de l'expérience clinique. Ce qui rend difficile l'expérience du laboratoire, c'est que l'excitant du processus reste inconnu. Nous possédons les moyens de provoquer chez les animaux une affection des articulations, mais cette affection diffère du rhumatisme articulaire de l'homme. Cependant nous pouvons approcher de l'expérience clinique par une autre voie. Comme moyen presque « spécifique » du traitement du rhumatisme, nous avons les préparations salicyliques, en particulier le salicylate de soude. L'administration de salicylate n'est pas toujours suivie d'une guérison complète, mais elle atténue la phase aiguë de la maladie. Si le trouble « rhumatismal » des organes se présente comme réfléchi et secondaire, tandis que le processus principal se trouve localisé dans le système nerveux, cela signifie que l'effet thérapeutique du salicylate est dû à son action non sur les organes atteints, mais sur le cerveau. Dans ce cas, l'expérience tout entière peut être effectuée, comme celle qui nous a servi à étudier l'action des sérums antitoxiques dans l'organisme, en employant la méthode du « pompage ».

Cette expérience était au surplus motivée par la circonstance que les préparations salicyliques, de même que les anticorps spécifiques, ne pénètrent pas du sang dans la région cérébro-médullaire on n'y pénètrent qu'à l'état de traces. Ce fait a été établi par les recherches de Livon et de Bernard et il a été

maintes fois confirmé par la suite. Les conditions individuelles de perméabilité des vaisseaux cérébraux ne sont pas identiques. Ceci explique peut-être que la cure du rhumatisme aigu au moyen du salicylate de soude n'est pas obtenue dans tous les cas. Donc, si l'on peut assurer une pénération plus efficace de différentes substances du sang dans la région cérébro-médullaire, on permettra aux rhumatisants aigus de subir l'action du salicylate dans les mêmes conditions.

Nous avons d'abord fait des expériences dans ce sens à la section thérapeutique de l'hôpital Oboukhow à Léninegrad. Elles ont été exécutées par M. A. Gorchkow et A. A. Babkow sous la surveillance générale du professeur I. I. Grekow, qui ne considérait pas le « pompage » chez une personne adulte comme une opération dangereuse ou même risquée, à la condition d'employer dans ce but une seringue de 10 cent. cubes et de n'évacuer que $\frac{1}{12}$ à $\frac{1}{15}$ du liquide céphalo-rachidien chez l'homme. Avant de procéder aux expériences, Gorchkow et Babkow tirèrent des archives de l'hôpital Oboukhow un extrait de 224 observations de malades traités à l'hôpital au cours de ces deux dernières années. Ces observations concernaient des malades atteints de rhumatisme aigu, dont 127 pour la première fois. Tous avaient été soumis à un traitement prolongé par des préparations salicyliques à la dose de 3,0-10,0 de salicylate de soude *pro die*, compresses, bains, enveloppements salicyliques, etc. Beaucoup d'entre eux avaient reçu des injections intraveineuses de salicylate de soude. Parmi les 127 malades atteints de rhumatisme aigu pour la première fois, 48 p. 100 se rétablirent, 46 p. 100 furent améliorés et 6 p. 100 quittèrent l'hôpital sans amélioration. Parmi les 97 patients atteints de récidives de rhumatisme aigu, 33 p. 100 quittèrent l'hôpital guéris, 64 p. 100 en voie d'amélioration et 3 p. 100 sans amélioration. Les premiers signes d'une amélioration de la maladie se manifestèrent chez tous ces patients en moyenne le douzième ou le quinzième jour du traitement.

Pour l'exécution des expériences avec « pompage » il fut décidé d'employer le salicylate de soude à l'intérieur aux doses de 5,0-6,0 *pro die*, cette dose étant la moyenne de celles administrées à l'hôpital.

Jusqu'à présent Gorchkow et Babkow ont fait environ

40 observations de rhumatisme aigu en utilisant le « pompage ». Dans tous les cas, à l'exception de deux, le « pompage » n'était exécuté qu'une seule fois. Si le patient n'avait pas été soumis au traitement salicylique ou s'il avait cessé d'en user en raison de l'absence d'un effet thérapeutique, le salicylate de soude était administré la veille ou le jour de l'opération, et les jours suivants. Le « pompage » était effectué par ponction lombaire, généralement chez le malade assis. Les expériences antérieures d'un de mes collaborateurs, le D^r I. A. Pigalew, ont montré que pour exécuter le « pompage » chez l'homme il est plus aisé d'utiliser la ponction non entre les 4^e et 5^e vertèbres lombaires, mais entre la 5^e vertèbre et la 1^{re} sacrée, le canal y étant plus large et l'adhérence des racines à l'orifice de l'aiguille, au cours de l'évacuation du liquide céphalo-rachidien, s'y produisant plus rarement. L'opération était exécutée de la manière suivante. Le liquide céphalo-rachidien ayant apparu, la seringue « Record » de 10 cent. cubes était appliquée sur l'aiguille ; on la remplissait de liquide et on le réintroduisait immédiatement. Cette opération étant répétée cinq à dix fois, on versait le liquide dans une éprouvette, on remplaçait la seringue sur l'aiguille et on répétait le « pompage » cinq à dix fois. La dernière portion du liquide étant évacuée de la même manière, l'opération était terminée. Le liquide était évacué et réintroduit ni trop lentement, ni trop rapidement. Dans les cas d'une évacuation rapide du liquide céphalo-rachidien, surtout dans la seconde période de l'opération, on obtenait invariablement des sensations douloureuses dans la région de la tête. Le mal de tête éprouvé dès ce moment ne cessait durant toute la journée et persistait parfois le jour suivant.

Les résultats de ces expériences ont confirmé les hypothèses que nous avons émises.

Les premiers symptômes d'une amélioration chez la plupart des malades furent notés non dans les dix ou quinze premiers jours, mais dès la dixième ou la vingt-quatrième heure après le « pompage ». Ceci concerne non seulement l'amélioration de l'état général, mais aussi les symptômes tels que rougeur et tuméfaction œdémateuse des articulations. Dans un grand nombre de cas, vingt-quatre à quarante-huit heures après le « pompage », on a noté non seulement une diminution, mais

une disparition complète de la rougeur et de l'œdème des articulations atteintes. Parmi les 40 malades observés, plusieurs étaient atteints de rhumatisme aigu depuis quelques semaines. Tous avaient été soumis à un traitement prolongé par des quantités considérables de salicylate de soude administré *per os* et par injections intraveineuses. Non seulement ils n'avaient manifesté aucun signe d'amélioration, mais leur état général s'était aggravé et les articulations restées indemnes avaient été successivement atteintes. L'action curative du « pompage » se manifesta au cours des premières vingt-quatre heures, et cinq ou sept jours après les patients se considéraient eux-mêmes comme guéris.

Plus le « pompage » était rapproché du début de la maladie, plus promptement et plus facilement survenait la guérison. Un effet thérapeutique complet fut également obtenu dans une série de cas de rhumatisme aigu négligés, qui avaient résisté au traitement salicylique. Dans quelques cas, des malades qui étaient restés longtemps immobilisés sur leur lit purent marcher sans aide au bout de deux à quatre jours.

M. A. Gorchkow et A. A. Babkow eurent aussi recours au « pompage » dans un petit nombre de cas de rhumatisme chronique, mais ici l'effet de l'acide salicylique fut moins efficace. Dans les cas de rhumatisme chronique invétéré l'effet curatif fut nul.

Le résultat des expériences les amena à la conclusion suivante, conforme à celle que nous avons formulée à la suite de notre étude sur l'action des antitoxines des sérums spécifiques dans l'organisme : la condition nécessaire de l'effet curatif du salicylate de soude sur les tissus atteints au cours du rhumatisme aigu est d'assurer sa pénétration dans la région cérébro-médullaire, et de favoriser son action sur la cellule nerveuse. D'où l'on peut déduire que les affections des tissus périphériques au cours du rhumatisme aigu ne sont pas le résultat de l'action directe d'un excitant sur le tissu.

Les expériences des D^{rs} I. A. Pigalew et Z. G. Kousnelzow, exposées dans le chapitre précédent, permettent de supposer que l'excitant ayant agi une fois peut ensuite ne pas se conserver dans la cellule nerveuse elle-même. La structure et les fonctions de cette cellule ayant été modifiées par l'excitant continueront à

entretenir les troubles trophiques de la périphérie. Leur cessation témoignera non de la disparition de l'excitant, mais du rétablissement de l'état normal de la cellule nerveuse, mais ce rétablissement serait toujours incomplet. Les affections réitérées de la cellule nerveuse y produiront des altérations encore plus stables, ainsi que, par conséquent, dans les tissus avoisinants. Enfin, après un certain délai, le rétablissement de l'état normal de la cellule nerveuse sera impossible; c'est alors que les troubles périphériques se stabiliseront définitivement et deviendront chroniques. Les préparations salicyliques exercent une action favorable sur la cellule nerveuse au début du rhumatisme aigu. Mais dans la suite les altérations de la cellule nerveuse sont telles que cette médication n'a plus aucun effet.

L'interprétation pathogénique du rhumatisme aigu conduit ainsi à l'application d'une méthode thérapeutique efficace. En admettant que les modifications des organes au cours de cette affection s'effectuent par le même processus que les troubles trophiques, il devient aisé de comprendre ce fait que les réactions des tissus locaux ne dépendent pas de la présence ou de l'absence de l'excitant au siège même de la réaction et pourquoi le rhumatisme est incurable sous sa forme chronique. Enfin nous pouvons expliquer la cause de la récurrence fréquente et l'absence d'immunité malgré le caractère infectieux du processus.

La genèse du rhumatisme permet de distinguer trois périodes. La première est infectieuse, lorsque le processus est encore localisé dans la gorge, les cavités nasales ou la cavité d'une dent cariée. Puis les toxines et les divers produits inflammatoires gagnent par l'intermédiaire des nerfs la cellule nerveuse de tel ou tel segment. Dès lors le processus acquiert un caractère toxique. Ensuite, le mal s'étend à la cellule nerveuse et il se reflète dans les tissus périphériques. Le processus toxique se transforme en processus « trophique ». Le foyer infectieux peut s'éteindre rapidement; néanmoins le rhumatisme se développera par suite du trouble trophique de la cellule nerveuse. Les travaux du laboratoire de I. P. Pawlow sur l'écorce cérébrale du chien, et ceux de A. A. Oukhtomsky sur d'autres cellules nerveuses, ont montré que la cellule en état d'excitation

attire toutes les excitations produites dans d'autres domaines du système nerveux. De ce fait, chaque processus ayant pour siège un endroit différent quelconque (appendicite, entéro-colite, etc.) se montre capable de renforcer l'excitation morbide de la cellule nerveuse, ce qui retentira immédiatement dans les tissus périphériques. C'est ainsi qu'il faut interpréter le « penchant » du rhumatisme aigu à la récurrence et ensuite à la chronicité.

Ces considérations peuvent, dans une certaine mesure, être étendues à la grippe qui confère également une immunité de courte durée, récidive fréquemment et se manifeste par des modifications des tissus périphériques, au niveau de la ramification du nerf trijumeau (rhinite, conjonctivite, inflammation des cavités supplémentaires du nez et de l'oreille moyenne, herpès). Elles sont également applicables à d'autres affections, telles que la gonorrhée. La gonorrhée, en effet, d'abord aiguë, revêt ensuite aisément un caractère chronique ; à ce stade elle est à peu près incurable. Dans un nombre considérable de cas de gonorrhée chronique, on ne réussit pas à trouver le microbe spécifique en dépit des recherches les plus minutieuses. En admettant que la gonorrhée se développe en trois périodes, comme le rhumatisme (périodes infectieuse, toxique et trophique), on comprendra comment les altérations inflammatoires chroniques persistent dans les tissus en l'absence d'un excitant spécifique, et pourquoi elles résistent au traitement spécifique, puisque le processus même cesse d'être spécifique. On peut admettre que même dans les cas de gonorrhée chronique, où les tissus atteints renferment encore des gonocoques, ceux-ci n'entretiennent plus l'inflammation, mais qu'ils se comportent comme des saprophytes, de même que les autres microbes qui se fixent dans les tissus dont l'état trophique a été troublé. Un de mes collaborateurs, le Dr G. S. Epstein, étudie actuellement ces questions.

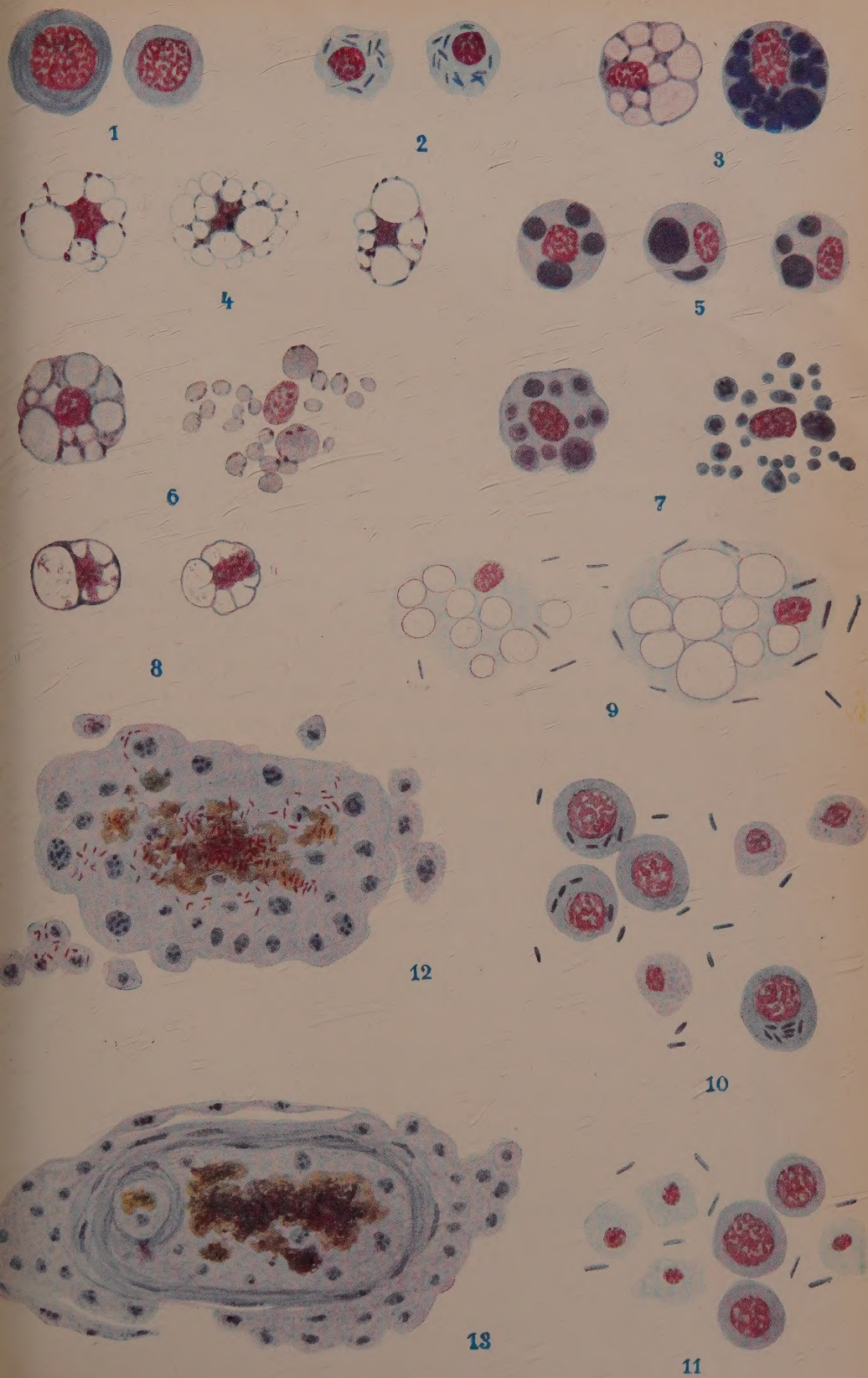
Si notre hypothèse est juste, elle peut avoir des conséquences pratiques. Le traitement visant dès le début la cellule nerveuse permettra de prévenir nombre de complications graves du rhumatisme, en première ligne les « maladies organiques du cœur ».

Je me permets de répéter que les expériences de traitement

du rhumatisme aigu par les préparations salicyliques suivi du « pompage » sont encore insuffisantes pour considérer cette méthode comme étant absolument au point. D'autre part nous ne sommes pas encore absolument certains que ce procédé ne comporte pas de suites fâcheuses. Les seuls incidents que nous ayons observés jusqu'ici sont identiques à ceux qui accompagnent une simple ponction lombaire suivie de l'évacuation du liquide céphalo-rachidien (mal de tête, rarement vomissement).

La conception pathogénique ci-dessus exposée étant admise, toutes les méthodes externes de traitement du rhumatisme ou de ses suites, telles que : enveloppements, onguents, compresses, bains de boues minérales et bains sulfureux, acquièrent une autre signification. Toutes ces médications agissent parce qu'elles sont appliquées sur le tégument. La chaleur humide, amollissant l'épiderme, contribue à mettre en contact les substances médicamenteuses et les autres agents avec les terminaisons nerveuses cutanées, d'où ces substances peuvent gagner la région cérébro-médullaire par la voie nerveuse. La vérification de cette hypothèse pourrait contribuer à obtenir de meilleurs résultats thérapeutiques et peut-être aussi à remplacer le traitement balnéaire compliqué et coûteux par un autre moins onéreux et non moins efficace.

Le Gérant : G. MASSON.



LOUIS BOËZ

1888-1930

L'Institut Pasteur vient encore de faire une perte douloureuse. Louis Boëz, directeur de notre plus ancienne et importante filiale de Saïgon, est mort à Dalat (Indochine), le 24 mars 1930, après une courte maladie. L'hommage émouvant que lui ont rendu, le jour de ses obsèques, le Gouvernement de l'Indochine, les populations française et indigène, attestait la grande place qu'il avait acquise dans notre Colonie d'Extrême-Orient.

Louis Boëz avait débuté dans la microbiologie comme assistant à l'Institut Pasteur de Lille. Après la guerre il fut chargé de cours, puis professeur à l'Institut d'Hygiène de l'Université de Strasbourg. Ses travaux, notamment sur l'anaérobiose et la physiologie des microbes, son enseignement à la Faculté de Médecine de Strasbourg, ses missions aux États-Unis et au Canada, avaient attiré l'attention sur lui, et dans la direction de l'Institut Pasteur de Saïgon, qui lui avait été confiée il y a près de trois ans, il avait témoigné des qualités les plus remarquables d'organisateur et d'animateur. Tous ceux qui l'ont connu l'affectionnaient pour son exquise et délicate bonté, pour la droiture de son caractère et pour la sûreté de ses relations.

La famille pastorienne, dans laquelle il était entré, partage la douleur des siens et déplore cette disparition de Louis Boëz en plein épanouissement de sa jeune maturité, à l'heure où il allait donner toute sa mesure.

